

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



TESIS DOCTORAL

**Caracterización bioquímica y genética de la infantaricina A:
una nueva bacteriocina antineumocócica producida por la
cepa de origen lácteo *Streptococcus infantarius* subesp.
infantarius LP90**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Cristina Campanero Pintado

DIRECTORES

Luis M. Cintas Izarra
Carmen Herranz Sorribes
Pablo E. Hernández Cruz

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
DE LA INFANTARICINA A: UNA NUEVA BACTERIOCINA
ANTINEUMOCÓCICA PRODUCIDA
POR LA CEPA DE ORIGEN LÁCTEO
Streptococcus infantarius subesp. *infantarius* LP90**

TESIS DOCTORAL

CRISTINA CAMPANERO PINTADO

DIRECTORES:

LUIS M. CINTAS IZARRA

CARMEN HERRANZ SORRIBES

PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
DE LA INFANTARICINA A: UNA NUEVA BACTERIOCINA
ANTINEUMOCÓCICA PRODUCIDA
POR LA CEPA DE ORIGEN LÁCTEO
Streptococcus infantarius subesp. *infantarius* LP90**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de
“Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada
Cristina Campanero Pintado

Madrid, octubre de 2015



Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91-394 3749. Fax: 91-394 3743

LUIS M. CINTAS IZARRA, CARMEN HERRANZ SORRIBES Y PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA Y CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Caracterización bioquímica y genética de la infantaricina A: una nueva bacteriocina antineumocócica producida por la cepa de origen lácteo *Streptococcus infantarius* subesp. *infantarius* LP90”**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. Cristina Campanero Pintado, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Y, para que surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a cuatro de octubre de dos mil quince.

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Luis M. Cintas Izarra

Carmen Herranz Sorribes

Pablo E. Hernández Cruza

A mis padres, Manuel y María

A mi hermana Almudena y a mi cuñado Iván

A mis sobrinos, Álvaro y Gonzalo

A Queco y Marcos

*“Lado seas, mi Señor, con todas tus criaturas,
especialmente el señor hermano sol,
el cual es día, y por el cual nos alumbras.*

*Y él es bello y radiante con gran esplendor,
de ti, Altísimo, lleva significación.*

*Lado seas, mi Señor, por la hermana luna y las estrellas,
en el cielo las has formado luminosas y preciosas y bellas.*

*Lado seas, mi Señor, por el hermano viento,
y por el aire y el nublado y el sereno y todo tiempo,
por el cual a tus criaturas das sustento.*

*Lado seas, mi Señor, por la hermana agua,
la cual es muy útil y humilde y preciosa y casta.*

*Lado seas, mi Señor, por el hermano fuego,
por el cual alumbras la noche,
y él es bello y alegre y robusto y fuerte.*

*Lado seas, mi Señor, por nuestra hermana la madre tierra,
la cual nos sustenta y gobierna,
y produce diversos frutos con coloridas flores y hierba”*

San Francisco de Asís (del Cántico del Hermano Sol)

“Yo hago nuevas todas las cosas” (Ap. 21, 5)

Investigar es abrirse a los misterios de la Vida, es mimar un interrogante para ir descubriendo un poquito de la Verdad que se esconde en cada uno de ellos. Verdad que sólo podemos conocer y vivir de forma parcial porque, nuestra condición humana, nos limita el conocerla por completo. Investigar es observar y profundizar en el misterio de cómo la Vida se abre paso, es descubrir y abrirse al don de la contemplación.

El verdadero examen de la vida nos cuestiona sobre si hemos sido capaces de descubrir, vivir y responder a estos misterios y caminar hacia la Verdad última. Un camino que no hacemos solos pues siempre Alguien nos acompaña y nos regala personas que nos guían y orientan desde la experiencia vivida, así como compañeros y amigos con los que caminar juntos. Por ello, quisiera dar las gracias a todas las personas que, de un modo u otro, me han acompañado a lo largo de esta etapa de mi camino durante la cual he realizado mi Tesis Doctoral y han contribuido a que hoy tenga una mayor capacidad de descubrir y contemplar lo que se nos ha regalado mediante el estudio de la Vida a nivel molecular y microscópico.

A los directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria durante el periodo de realización de este trabajo de investigación, Lorenzo de la Hoz Perales y María Dolores Selgas Cortecero, por aceptarme en este Departamento, lugar donde he aprendido a mirar más allá de lo que se ve a simple vista. Gracias por la amable ayuda recibida en cada uno de los momentos que la necesité.

En todo camino es imprescindible la ayuda de personas que nos enseñen y orienten desde los conocimientos adquiridos y la experiencia ya vivida. Personas que ya recorrieron esta misma etapa y que guían con dedicación a los que igualmente quieren recorrerla. Por ello, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis Luis M. Cintas Izarra, Carmen Herranz Sorribes y Pablo E. Hernández Cruza. Gracias por acogerme en vuestro grupo de investigación, una oportunidad única para descubrir la belleza, así como los desafíos, en muchas ocasiones frustrantes, que implica trabajar con lo que no se ve; gracias por confiar en mí desde el principio y por ayudarme a crecer tanto a nivel profesional como personal.

Pero para llegar hasta esta etapa del camino antes tuve que recorrer otras durante las cuales mi inquietud por profundizar en el precioso y misterioso campo de la biología se fue despertando. Por ello, no quisiera olvidar a todos mis profesores que me acompañaron y formaron durante mi etapa en el colegio, en especial a Ana Moreno, Fernando Sánchez, Lourdes Palermo y Juan Pedro Berenguer, y posterior estudio de la Licenciatura de Veterinaria y Doctorado. De manera especial me gustaría dar las gracias a los que pertenecéis a este Departamento y que, de un modo u otro, habéis contribuido a que creciera en mí el deseo de conocer el apasionante y complejo mundo de la investigación. Gracias a Charo, Teresa, Isabel, Paloma, Ana, Juan Miguel, María, Leo, Eva y Belén por vuestra ayuda, consejos, risas y alguna que otra confidencia compartida.

Uno de los mejores regalos que te es dado cuando recorres un nuevo camino son los compañeros de fatiga. Esos compañeros que día a día caminan junto a ti y te ofrecen agua

cuando el sol se hace difícil de soportar y abrigo cuando la humedad cala y tu capa de agua ya no es suficiente. Esos compañeros que te donan su puñado de frutos secos cuando tus fuerzas flaquean y te tienden la mano constantemente cuando, cansado, te surge la duda de si elegiste el camino correcto. Por todo ello, quisiera dar las gracias de una manera especial a mis compañeros de camino de “punto Lab”: Bea, Juan, Loreto, Juanjo, Estefanía, Carlos y Sara. Gracias Bea por acogerme cuando llegué, enseñarme en mis comienzos con el mundo “minúsculo” y tenderme tu mano cada vez que lo he necesitado. Gracias Juan por tu ejemplo dado cada día, fue un gusto ser testigo de cómo vivías tu vocación por la investigación; gracias también por enseñarme el arte de la ironía (que bien empleado puede ser fuente de risas inagotable). Gracias Loreto por tu minuciosidad en el trabajo, en ti pude aprender la importancia de acariciar cada experimento; gracias por tu amistad, por las veces que me tendiste la mano, por las lágrimas compartidas y por esos debates tan enriquecedores en los que se podía leer tu coherencia de vida y respeto hacia los otros. Gracias Juanjo por el entusiasmo que transmitías en cada conversación, bien fuera de ciencia, de política o de religión; gracias por vibrar con esa pasión que te caracteriza, y gracias por ser amigo, ese amigo que te lleva la mochila cuando ya no puedes más, te coge de la mano y te invita a mirar más allá de tus huellas. Gracias Estefanía por tu ejemplo de tesón y de trabajo bien hecho, por ser ejemplo de “tener las cosas claras y luchar por ellas”; gracias por los momentos vividos entre debates, risas y lágrimas. Gracias Carlos por ser un ejemplo de actitud en el trabajo y en la vida, por enseñarme la importancia de vivir en lo positivo, y, cómo no, gracias por las risas compartidas escuchando Cadena 100 a las 9.30 h. Gracias Sara por esa tranquilidad que transmitías aunque estuvieras vibrando por dentro, por relajar la atmósfera cuando, con sólo una mirada, nos entendíamos y nos echábamos a reír a carcajadas; gracias por tus ánimos, por tu cariño y esa mirada transparente que habla por sí sola. Y, por supuesto, no quisiera olvidarme de otros compañeros “punto Lab” que me precedieron, Raquel, María, Antonio y Jorge, y que de alguna forma también me han ayudado a recorrer este largo camino; gracias por dejar vuestro legado en la estantería del laboratorio, porque aunque no os lo creáis, lo he llegado a estudiar en más de una ocasión.

Y cómo olvidarme de mis compañeros del “laboratorio del fondo” con los que he compartido muchas risas y también lágrimas durante este camino: Almu, Eugenia, María, Miguel, Diego y especialmente Nico, Silvia, Alicia e Inés. Gracias Nico por ser “una sonrisa con patas”, una verdadera profesional de la alegría que me recordaba la importancia de valorarse a una misma. Gracias Silvia por ser tan buena compañera, por esa entrega incondicional que te caracteriza y por tu búsqueda constante de la justicia. Gracias Alicia por tu sensibilidad y dulzura, por mostrar el rostro más amable de la vida, lo que era remanso de paz en las horas más duras. Y gracias Inés por tu alocada vida que tanto nos alegraba los momentos tristes y frustrantes, por tu vivacidad y constante alegría.

Y gracias también a mis compañeros del “laboratorio de al lado”. Gracias a Rebeca, Nivia, Arantxa, Virginia, Esther, Marta, Laura, Javi y Susana. Gracias por los momentos

compartidos, por la ayuda recibida en tantos momentos y por los ánimos dados. Además, quisiera recordar a los compañeros con los que he caminado y que, como savia nueva, enriquecieron el ambiente del laboratorio procedentes de lugares dispares. Gracias a Maliko, Tereza, Andreia, Clara, Yanina, Agustín y Yoshimitsu.

Y, por supuesto, no quisiera olvidarme de Santiago, Andrés, Alberto, Rosi y Aurora. Gracias a todos por las conversaciones y risas compartidas que amenizaban los largos días en el laboratorio; gracias por vuestra disponibilidad y amabilidad en cada momento. Santiago, siempre recordaré nuestras distendidas charlas futbolísticas.

Además, es importante recordar que todo experto caminante sabe que el camino siempre te depara sorpresas. En ocasiones debes enfrentarte al reto de abandonar el camino principal y adentrarte en otros caminos desconocidos que, en la mayoría de los casos, dan un poco de miedo. Sin embargo, Él nunca te deja a oscuras. En el camino siempre aparecen personas que te donan su farolillo para que tú puedas ver. Por ello, quisiera agradecer a todos aquellos grupos que de fuera del laboratorio me han acogido, han enriquecido mi Tesis Doctoral y, lo más importante, me han ayudado a crecer como persona. En primer lugar quisiera dar las gracias a la Dra. Rosa del Campo del Hospital Ramón y Cajal (Madrid, España) por acogerme infinidad de veces en su grupo de investigación; gracias, Rosa, por tu cariño, tu confianza en mí y en mi trabajo y por enseñarme a ver siempre el lado positivo; has sido una verdadera luz en momentos oscuros. Gracias también a Merche por su dedicación y simpatía. Quisiera agradecer igualmente a María Luisa Hernández de la Unidad de Proteómica del Parque Científico-UCM (Madrid, España) la constante y amable ayuda recibida en el análisis de muestras, así como en la explicación de los resultados obtenidos.

Thanks to Prof. Ingolf F. Nes and Prof. Colin Hill (Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway and University College of Cork, Ireland, respectively) for hosting me in their laboratories and for their supervision and help. Thanks to Prof. Dzung B. Diep and Dr. Des Field for their enthusiasm, patience and brilliant ideas. Also, thanks to all the PhD students and lab technicians that I met both in Ås and Cork. Thanks to Morten, Margareta, Emma and Dagim for your friendly help. I would especially like to thank to Dagim for your help at any time I needed at the lab, for listening to me and cheering me up when I was a little sad. And thanks to all my mates from the 337 lab at UCC: Karen, Lorraine, Alicia, Anne, Harsh, Tine and Brian. Thanks so much for making me feel like one of the lab. Thanks for your friendly help and for all funny moments shared. I would especially like to thank Brian. Thanks Brian for being a really good friend. A friend who made me feel as if I was at home putting my favorite song on the radio, going to the mass together, talking about football and watching the Champions matches at Old Oak, and of course, thanks for being the best and most patient English teacher

Quero agradecer ao Professor Doutor Gilberto Igrejas por receber-me no seu grupo de investigação na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Obrigado Professor pela

orientação e, principalmente, pela constante ajuda e preocupação para que eu me sentira “como em casa”, tanto no laboratório como fora dele. Quero igualmente agradecer à Professora Doutora Patrícia Poeta pela sua amabilidade. E, claro, agradeço a todos os meus colegas de laboratório: Hajer, Rui, Susana, Ricardo, Luís Costa e Alex. Muito obrigado por integrarem-me no grupo, pelas aulas de português, pelas visitas aos locais mais bonitos de Vila Real e Lisboa e por convidarem-me a experimentar os deliciosos pastéis de nata e as maravilhosas francesinhas. Quero agradecer em especial ao Alex e à sua família por receberem-me em sua casa, por ensinarem-me a apanhar cogumelos e também por assistir juntos os jogos da Champions.

Por otra parte, Él nunca olvida poner señales a lo largo del camino que te indican la dirección a seguir en los momentos de duda. Por ello, quisiera dar las gracias a todos aquellos que habéis sido preciosas señales a lo largo de estos años recordándome en todo momento cuál es el verdadero fin de todo camino. Gracias a Jose, David y Javi, sacerdotes y amigos, a la Comunidad de San Pablo y a mis chavales de catequesis. Gracias por enseñarme con vuestro testimonio de vida a hacer una lectura creyente de todo lo vivido durante la realización de esta Tesis Doctoral. Una lectura creyente que es el mejor regalo que me llevo de estos ocho años pues me ha enseñado a descubrir el soplo de Dios en el lenguaje de las primeras criaturas que poblaron la tierra, así como que, a pesar de los buenos o malos resultados obtenidos, el amor entregado, aunque sea de forma imperfecta, es lo que al final queda.

Y, para finalizar, no quisiera olvidarme de todas las veces en las que, mirando al suelo, te das cuenta de que no son tus huellas las que van dejando marca en el camino, sino las huellas de aquellos que te han llevado en brazos cuando tus fuerzas ya no te dejaban avanzar. Por ello, quisiera dar las gracias a Toñi, a Carmen y, especialmente, a mi familia. Toñi, gracias por tu entrega en el trabajo, por devolverme la esperanza y, sobre todo, la salud. Gracias a Carmen, mi amiga. Gracias por ser el espejo donde mirarme a lo largo de estos años. He aprendido de ti a ser justa, a luchar por lo que de verdad quiero y, lo más importante, a que el respeto de los otros se gana con el ejemplo que da la propia persona. Siempre te estaré agradecida porque, sin ti, nunca hubiera llegado al final de esta etapa.

Y, por supuesto, gracias a mi familia. Gracias a mi padre, mi madre, mi hermana, mi cuñado, mis sobrinos y, sobre todo, a Queco y a Marcos. La familia ha sido y sigue siendo el mejor regalo que Dios me ha dado desde que nací. En ella he aprendido a vivir y a crecer como persona. A ella le debo lo que soy. Gracias por todos los momentos en los que me habéis sostenido a lo largo de todos estos años, que no han sido pocos. Gracias por enseñarme que lo verdaderamente importante en la vida es el amor que entregas en cada momento, no el resultado obtenido. Quisiera dar las gracias de forma especial a mi hermana y a mis padres. Gracias hermana por ir siempre delante, abrirme el camino y por haber sido y seguir siendo uno de los principales referentes de mi vida. Gracias papá por enseñarme la importancia del esfuerzo en la vida y por ser, junto a mamá, el mejor ejemplo de cómo amar y formar una

familia; espero que “desde allí arriba” estés orgulloso de mí. Gracias mami por tu testimonio de vida, sencillo y lleno de entrega. Y, cómo no, gracias a Queco y a Marcos. Con vosotros recuerdo cada día lo que es verdaderamente esencial en la vida... llegar a casa y poder abrazaros.

Quisiera agradecer a la Universidad Complutense de Madrid (UCM) la concesión de una Beca Predoctoral para la Formación de Personal Investigador (Becas Complutense Predoctorales en España 2009), así como la subvención para realizar una estancia de movilidad en el *Laboratory of Microbial Food Safety (University College of Cork, Cork, Ireland)* y poder así optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”. De la misma forma quisiera dar las gracias al Ministerio de Educación y al Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) por la subvención para realizar una estancia en el *Laboratory of Microbial Gene Technology (Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway)* y en el *Departamento de Genética e Biotecnología (Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal)*, respectivamente. Igualmente quisiera agradecer a la empresa Innaves S.A. su apoyo económico durante el primer año y medio de mi trabajo de investigación.

Este trabajo ha sido realizado con fondos concedidos por la Comunidad de Madrid (CAM, Proyectos S2009/AGR-1469, S2009/AGR-1489 y S2013/ABI-2747), Banco Santander Central Hispano-Universidad Complutense de Madrid (BSCH-UCM, Proyectos GR58/08 y GR35-10-A), Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT, Proyectos AGL2009-08348-ALI y Consolider INGENIO 2010 CSD2007-00063 FUN-C-FOOD), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Proyecto AGL2012-34829), MICINN (Proyecto *Spanish-Portuguese Integrated Action* HP2008-0070) y Xunta de Galicia (Proyecto 07CSA007E).

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	5
 CAPÍTULO I/CHAPTER I	
EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS	9
GENERAL ACCOUNT OF THE RESEARCH SUBJECT: OBJECTIVES	15
 CAPÍTULO II	
INTRODUCCIÓN.....	21
II.1. BACTERIAS LÁCTICAS	23
II.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	23
II.1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	24
II.1.3. APLICACIONES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA ALIMENTACIÓN Y LA SALUD HUMANA Y ANIMAL	24
II.1.3.1. BACTERIAS LÁCTICAS EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS FERMENTADOS	24
II.1.3.2. BACTERIAS LÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS	27
II.1.3.2.1. Definición y principales características de los probióticos.....	27
II.1.3.2.2. Evaluación de la seguridad de los probióticos	28
II.1.3.2.3. Bacterias lácticas como probióticos en personas	30
II.1.3.2.4. Bacterias lácticas como probióticos en alimentación animal. Aditivos zootécnicos	33
II.1.3.3. BACTERIAS LÁCTICAS COMO VACUNAS ORALES	34
II.1.3.4. BACTERIAS LÁCTICAS COMO PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS NUTRACÉUTICAS.....	34
II.1.4. ASPECTOS HIGIÉNICO-SANITARIOS NEGATIVOS ASOCIADOS A LAS BACTERIAS LÁCTICAS	35
II.1.4.1. BACTERIAS LÁCTICAS COMO ALTERANTES DE LOS ALIMENTOS	35

Cristina Campanero Pintado
iv

II.1.5.5.4.5. Enfermedades neumocócicas invasivas	65
II.1.5.5.5. Resistencia a antibióticos en <i>S. pneumoniae</i>	66
II.1.5.5.5.1. Resistencia a los β -lactámicos	66
II.1.5.5.5.2. Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas	68
II.1.5.5.5.3. Resistencia a tetraciclinas	68
II.1.5.5.5.4. Resistencias múltiples	69
II.1.5.5.6. La vacunación como estrategia para el control de las infecciones producidas por <i>S. pneumoniae</i>	69
II.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL	71
II.2.1. BACTERIOCINAS	73
II.2.1.1. DEFINICIÓN	73
II.2.1.1.1. Bacteriocinas vs. antibióticos	74
II.2.1.2. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS vs. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	74
II.2.1.2.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas	75
II.2.1.2.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas	77
II.2.2. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS	77
II.2.2.1. CLASIFICACIÓN	78
II.2.2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y ESTRUCTURA	81
II.2.2.3. ESPECTRO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA	83
II.2.2.4. MECANISMO DE ACCIÓN	84
II.2.2.5. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS	87
II.2.2.5.1. Gen(es) estructural(es)	89
II.2.2.5.2. Gen(es) de inmunidad	90
II.2.2.5.3. Genes de transporte y procesamiento	92

II.2.2.5.3.1. Sistema de transporte del tipo ABC o sistema de transporte dedicado	92
II.2.2.5.3.2. Sistema Sec o ruta general de secreción	95
II.2.2.5.3.2.1. Componentes integrales de membrana de la translocasa	96
II.2.2.5.3.2.2. SecB y partícula reconocedora de señal (SRP)	96
II.2.2.5.3.2.3. SecA y mecanismo de translocación proteica	96
II.2.2.5.3.2.4. Peptidasa señal.....	97
II.2.2.5.4. Genes de regulación de la producción: sistema de transducción de señal de tres componentes	98
II.2.2.5.4.1. Péptido inductor.....	99
II.2.2.5.4.2. Proteína histidín-quinasa y proteína reguladora de respuesta: transducción de señal.....	100
II.2.2.6. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS DEL GÉNERO <i>Streptococcus</i>	101
II.2.2.7. APLICACIONES	103
II.2.2.7.1. Bacteriocinas como agentes terapéuticos.....	103
II.2.2.7.1.1. Empleo de técnicas de ingeniería genética para mejorar el potencial terapéutico de las bacteriocinas	105
II.2.2.7.2. Bacteriocinas en la industria alimentaria	106
II.2.2.7.2.1. Bioconservación de los alimentos.....	107
II.2.2.7.3. Otras aplicaciones	110
II.2.2.8. RESISTENCIA FRENTE A LAS BACTERIOCINAS	112
II.2.2.8.1. Resistencia cruzada con antibióticos	114
II.2.2.9. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA.....	115

CAPÍTULO III/CHAPTER III

***Streptococcus infantarius* LP90: UNA CEPA BACTERIOCINOGENICA
DE ORIGEN LÁCTEO CON ACTIVIDAD ANTINEUMOCÓCICA**

<i>Streptococcus infantarius</i> LP90: A BACTERIOCINOGENIC STRAIN OF DAIRY ORIGIN WITH ANTI-PNEUMOCOCCAL ACTIVITY	119
III.1. ABSTRACT	121
III.2. INTRODUCTION	122
III.3. MATERIALS AND METHODS	125
III.3.1. Bacterial strains, growth media and culture conditions	125
III.3.2. Antimicrobial activity assays	125
III.3.3. Taxonomic identification of <i>Streptococcus</i> sp. LP90.....	127
III.3.4. Influence of growth media and incubation conditions on bacterial growth, culture-pH and anti-pneumococcal activity of <i>S. infantarius</i> LP90.....	128
III.3.5. Physicochemical stability of the anti-pneumococcal compound secreted by <i>S. infantarius</i> LP90.....	128
III.3.5.1. Sensitivity to heat	128
III.3.5.2. Sensitivity to pH	128
III.3.5.3. Sensitivity to proteolytic, lipolytic and glycolytic enzymes	128
III.3.6. Safety assessment of <i>S. infantarius</i> LP90	129
III.3.6.1. Antimicrobial susceptibility testing	129
III.3.6.2. Detection of virulence factors	129
III.3.6.2.1. Phenotypic detection of virulence factors.....	129
III.3.6.2.2. PCR-detection of genes encoding virulence factors	130
III.3.6.3. Biogenic amine production	130
III.3.6.3.1. Differential growth medium for the screening of histidine, tyrosine and ornithine decarboxylase activities	130
III.3.6.3.2. PCR-detection of HDC, TDC and ODC genes	132

III.3.6.4. Determination of enzymatic activities	132
III.3.6.5. Degradation of mucin	133
III.3.6.6. Deconjugation of bile salts.....	133
III.3.7. PCR-detection of streptococcal and enterococcal bacteriocin structural genes in <i>S. infantarius</i> LP90.....	133
III.3.8. Purification, mass spectrometry and amino acid sequencing of the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by <i>S. infantarius</i> LP90	135
III.4. RESULTS.....	135
III.4.1. Antimicrobial activity of bacteriocinogenic LAB against clinical <i>S. pneumoniae</i> strains.....	135
III.4.2. Taxonomic identification of <i>Streptococcus</i> sp. LP90	140
III.4.3. Influence of growth media and incubation conditions on bacterial growth, culture-pH and anti-pneumococcal activity of <i>S. infantarius</i> LP90.....	140
III.4.4. Physicochemical stability of the anti-pneumococcal compound secreted by <i>S. infantarius</i> LP90.....	140
III.4.5. Safety assessment of <i>S. infantarius</i> LP90	142
III.4.6. PCR-detection of streptococcal and enterococcal bacteriocin structural genes in <i>S. infantarius</i> LP90.....	143
III.4.7. Purification, mass spectrometry and amino acid sequencing of the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by <i>S. infantarius</i> LP90	144
III.5. DISCUSSION	146
III.6. REFERENCES.....	149

CAPÍTULO IV/CHAPTER IV

**ANÁLISIS GENÉTICO Y TRANSCRIPCIONAL
DE UN *CLUSTER* MULTIBACTERIOCINOGENICO
DE LA CEPA ANTINEUMOCÓCICA DE ORIGEN LÁCTEO
Streptococcus infantarius LP90**

GENETIC AND TRANSCRIPTIONAL ANALYSES OF A MULTIBACTERIOCINOGENIC CLUSTER FROM THE ANTI-PNEUMOCOCCAL DAIRY STRAIN <i>Streptococcus infantarius</i> LP90	159
IV.1. ABSTRACT	161
IV.2. INTRODUCTION	161
IV.3. MATERIAL AND METHODS	163
IV.3.1. Bacterial strains and culture conditions	163
IV.3.2. DNA isolation and nucleotide sequencing	163
IV.3.3. Transcriptional analysis of a multibacteriocinogenic gene cluster from <i>S. infantarius</i> LP90	164
IV.3.4. Purification and mass spectrometry of the bacteriocins secreted by <i>S. infantarius</i> LP90	165
IV.3.5. Colony mass spectrometry	166
IV.4. RESULTS	166
VI.4.1. Nucleotide sequence and organization of the multibacteriocinogenic gene cluster from <i>S. infantarius</i> LP90	166
VI.4.2. Transcriptional analysis of the multibacteriocinogenic gene cluster from <i>S. infantarius</i> LP90	175
VI.4.3. Purification and mass spectrometry of the bacteriocin secreted by <i>S. infantarius</i> LP90	177
VI.4.3.1. Bacteriocin purification procedure based on cation-exchange and reverse-phase chromatographies in an ÄKTA-FPLC system (procedure P1)	177

VI.4.3.2. Bacteriocin purification procedure based on anion-exchange and hydrophobic-interaction batch chromatographies followed by reverse-phase chromatography in an ÄKTA-FPLC system (procedure P2)	179
VI.4.3.3. Partial bacteriocin purification procedure based on cation-exchange and hydrophobic-interaction batch chromatographies (procedure P3)	182
IV.4.4. Colony mass spectrometry	182
IV.5. DISCUSSION	183
IV.6. REFERENCES	188
 CAPÍTULO V/CHAPTER V	
PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LAS INFANTARICINAS A₁ Y A₂ POR <i>Pichia pastoris</i> Y <i>Lactococcus lactis</i>	
HETEROLOGOUS PRODUCTION OF INFANTARICINS A₁ AND A₂ BY <i>Pichia pastoris</i> AND <i>Lactococcus lactis</i>	
V.1. ABSTRACT	193
V.2. INTRODUCTION	194
V.3. MATERIAL AND METHODS	196
V.3.1. Microorganisms, plasmids, media and culture conditions	196
V.3.2. Basic genetic techniques and enzymes	198
V.3.3. PCR and nucleotide sequencing.....	198
V.3.4. Evaluation of <i>Pc. pastoris</i> as host for the heterologous production of InfA ₁ and InfA ₂	200
V.3.4.1. Construction of the recombinant plasmids derived from pPICZαA and transformation in <i>Ec. coli</i> and <i>Pc. pastoris</i> X-33.....	200
V.3.4.2. Detection of antimicrobial activity of the <i>Pc. pastoris</i> recombinant strains and partial purification of InfA ₁ and InfA ₂	201
V.3.5. Evaluation of <i>L. lactis</i> NZ9000 as host for the heterologous production of InfA ₁ and InfA ₂	203

V.3.5.1. Construction of recombinant plasmids derived from pMG36c and transformation in <i>Ec. coli JM109</i> and <i>L. lactis NZ9000</i>	203
V.3.5.2. Detection of antimicrobial activity of the <i>L. lactis</i> recombinant strains and purification and mass spectrometry analysis of <i>InfA₁</i> and <i>InfA₂</i>	205
V.4. RESULTS	206
V.4.1. Cloning of <i>infA₁</i> and <i>infA₂</i> in the <i>Pc. pastoris</i> expression and secretion vector pPICZαA	206
V.4.2. Heterologous expression and secretion of biologically active <i>InfA₁</i> and <i>InfA₂</i> by recombinant <i>Pc. pastoris</i>	206
V.4.3. Cloning of <i>infA₁</i> and <i>infA₂</i> in the <i>L. lactis</i> expression and secretion vector pMG36c	207
V.4.4. Heterologous expression and secretion of biologically active <i>InfA₁</i> and <i>InfA₂</i> by recombinant <i>L. lactis</i>	208
V.5. DISCUSSION	216
V.6. REFERENCES	219
 CAPÍTULO VI /CHAPTER VI	
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA INFANTARICINA A (INFANTARICINAS A₁ Y A₂) DE <i>Streptococcus infantarius</i> LP90 FRENTE A <i>Streptococcus pneumoniae</i> EN CALDO DE CULTIVO, SALIVA HUMANA Y UN SISTEMA MODELO DE BIOFILM	
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF INFANTARICIN A (INFANTARICINS A₁ Y A₂) OF <i>Streptococcus infantarius</i> LP90 AGAINST <i>Streptococcus pneumoniae</i> IN BROTH, HUMAN SALIVA AND A BIOFILM MODEL SYSTEM	
	225
VI.1. ABSTRACT	227
VI.2. INTRODUCTION	228
VI.3. MATERIAL AND METHODS	230
VI.3.1. Bacterial strains and culture conditions	230
VI.3.2. Purification of <i>InfA₁</i> from <i>Streptococcus infantarius</i> LP90	230

VI.3.3. Chemical synthesis of InfA ₁ and InfA ₂	231
VI.3.4. Anti-pneumococcal activity of InfA ₁ purified from Streptococcus infantarius LP90 and the chemically-synthesized peptides InfA _{1-S} and InfA _{2-S}	231
VI.3.5. Mode of action of Streptococcus infantarius LP90 concentrated supernatants, InfA _{1-P} and the chemically-synthesized peptides InfA _{1-S} and InfA _{2-S}	231
VI.3.6. Effect of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) on S. pneumoniae biofilms.....	232
VI.3.7. Stability of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) in human saliva	232
VI.3.8. Mode of action of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) against S. pneumoniae in human saliva	233
VI.3.9. Effect of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) on saliva microbiota.....	233
VI.4. RESULTS	234
VI.4.1. Comparative anti-pneumococcal activity of InfA _{1-P} and the chemically-synthesized peptides InfA _{1-S} and InfA _{2-S}	234
VI.4.2. Mode of action of Streptococcus infantarius LP90 concentrated supernatants, InfA _{1-P} and the chemically-synthesized peptides InfA _{1-S} and InfA _{2-S} against S. pneumoniae in broth	235
VI.4.3. Effect of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) on S. pneumoniae biofilms.....	236
VI.4.4. Stability of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) in human saliva	237
VI.4.5. Mode of action of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) against S. pneumoniae in human saliva	238
VI.4.6. Effect of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) on saliva microbiota.....	239
VI.5. DISCUSSION.....	241
VI.6. REFERENCES	244

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN INTEGRADORA	249
VII.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA COLECCIÓN DE BAL BACTERIOCINOGÉNICAS DE DISTINTOS ORÍGENES FRENTE A AISLADOS CLÍNICOS DE <i>S. pneumoniae</i>: EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA SEGURIDAD DE <i>S. infantarius</i> LP90 Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BACTERIOCINA ANTINEUMOCÓCICA INFA₁	252
VII.1.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA COLECCIÓN DE BAL BACTERIOCINOGÉNICAS DE DISTINTOS ORÍGENES FRENTE A AISLADOS CLÍNICOS DE <i>S. pneumoniae</i>	252
VII.1.2. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LA SEGURIDAD DE <i>S. infantarius</i> LP90.....	254
VII.1.3. PURIFICACIÓN, ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SECUENCIA AMINOACÍDICA DE INFA ₁ (3.963 Da)	255
VII.2. ANÁLISIS GENÉTICO Y TRANSCRIPCIONAL DEL <i>CLUSTER</i> GÉNICO DE INFA (INFA₁-INFA₂).....	257
VII.2.1. SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA Y ANÁLISIS DEL <i>CLUSTER</i> GÉNICO DE INFA (INFA ₁ -INFA ₂) EN <i>S. infantarius</i> LP90.....	257
VII.2.2. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DEL <i>CLUSTER</i> GÉNICO DE INFA (INFA ₁ -INFA ₂) DE <i>S. infantarius</i> LP90.....	259
VII.2.3. PURIFICACIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS BACTERIOCINAS SECRETADAS POR <i>S. infantarius</i> LP90	260
VII.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE INFA₁ E INFA₂ POR <i>Pc. pastoris</i> Y <i>L. lactis</i>	263
VII.3.1. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE INFA ₁ E INFA ₂ POR <i>Pc. pastoris</i>	264
VII.3.2. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE INFA ₁ E INFA ₂ POR <i>L. lactis</i> subesp. <i>cremoris</i>	266
VII.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE INFA (INFA₁-INFA₂) FRENTE A <i>S. pneumoniae</i> EN CALDO DE CULTIVO, SALIVA HUMANA Y UN SISTEMA MODELO DE <i>BIOFILM</i>	269
VII.4.1. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEUMOCÓCICA DE INFA ₁ (3.963 Da) E INFA ₁ E INFA ₂ SINTETIZADAS QUÍMICAMENTE.....	270

VII.4.2. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE UN SOBRENADANTE CONCENTRADO DE <i>S. infantarius</i> LP90, INFA _{1-P} E INFA _{1-S} Y/O INFA _{2-S} FRENTE A <i>S. pneumoniae</i> EN CALDO DE CULTIVO	270
VII.4.3. EFECTO DE INFA _S SOBRE LA FORMACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>BIOFILMS</i> POR <i>S. pneumoniae</i>	271
VII.4.4. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD FUNCIONAL Y DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE INFA _S FRENTE A <i>S. pneumoniae</i> EN SALIVA HUMANA	272
VII.4.5. EFECTO DE INFA _S SOBRE LA MICROBIOTA DE LA SALIVA	273
 CAPÍTULO VIII/CHAPTER VIII	
CONCLUSIONES	275
CONCLUSIONS	279
 CAPÍTULO IX	
BIBLIOGRAFÍA	283
 APÉNDICES	
APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS	345
1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS GENERALES	345
2. ABREVIATURAS DE UNIDADES	349
3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS	350
4. ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS	351
APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO	352
APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS	352
APÉNDICE 4. GLOSARIO	353
APÉNDICE 5. LISTADO DE TABLAS	358
APÉNDICE 6. LISTADO DE FIGURAS	360

RESUMEN

En este trabajo se ha investigado la utilidad del empleo de bacterias lácticas, principalmente de origen alimentario, y/o sus bacteriocinas como estrategia alternativa o complementaria a los antibióticos para el control de las infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae* en humanos, empleando para ello diversas técnicas microbiológicas, bioquímicas y genéticas. En el Capítulo III se describe la evaluación de la actividad antimicrobiana de 38 BAL bacteriocinogénicas frente a cepas clínicas de *S. pneumoniae* de diversos serotipos y patrones de susceptibilidad a los antibióticos más empleados en medicina humana utilizando ensayos de antagonismo microbiano (*i. e.*, inhibición por siembra en picadura [ISP], técnica de difusión en agar [TDA] y ensayo en placas microtituladoras [EPM]). *Streptococcus infantarius* subesp. *infantarius* LP90, una cepa aislada de leche de búfala de Venezuela, destacó por su amplio y potente espectro de acción frente a *S. pneumoniae*, por lo que fue seleccionada para su posterior caracterización. La purificación mediante un protocolo multicromatográfico de las bacteriocinas producidas por *S. infantarius* LP90, así como su análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, permitió determinar que la actividad antineumocócica de esta cepa es debida a la producción de, al menos, una nueva bacteriocina con una masa molecular de 3.963 Da a la que se denominó infantaricina A (InfA). La comparación de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de 19 aminoácidos de InfA, obtenida mediante degradación N-terminal de Edman, con las de otras proteínas depositadas en la base de datos *Genbank* reveló una elevada homología con una hipotética proteína de *S. infantarius* ATCCBAA-102. En el Capítulo IV se describe el análisis genético y transcripcional de un *cluster* multibacteriocinogénico de 17.730 pb de *S. infantarius* LP90, así como la identificación de las bacteriocinas secretadas mediante su purificación a homogeneidad y espectrometría de masas MALDI-TOF. El análisis informático de la secuencia genética del *cluster*, obtenida mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación nucleotídica, reveló la presencia de: (i) 12 genes que codifican 7 hipotéticas bacteriocinas, entre las que se incluyen 5 bacteriocinas de la subclase IIb o sistemas de dos péptidos: InfA (InfA₁-InfA₂), infantaricina B (InfB₁-InfB₂), infantaricina C (InfC₁-InfC₂), infantaricina D (InfD₁-InfD₂) e infantaricina G (InfG₁-InfG₂) y dos bacteriocinas de un solo péptido que se denominaron infantaricina E e infantaricina F y (ii) 17 genes que codifican proteínas involucradas en la secreción, inmunidad y regulación de la producción de estas bacteriocinas. De acuerdo con la masa molecular calculada de InfA₁ (3.357 Da), InfA purificada de *S. infantarius* LP90 tendría una masa molecular con, aproximadamente, 600 Da adicionales (3.963 Da). El análisis transcripcional del *cluster* multibacteriocinogénico mediante PCR acoplado a la transcripción inversa (RT-PCR) reveló la expresión de todos los genes del *cluster* excepto de los implicados en la regulación de la producción de las bacteriocinas. Por otra parte, el análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de los péptidos purificados de *S. infantarius* LP90 mediante el empleo de distintos protocolos multicromatográficos reveló que, además de la bacteriocina antineumocócica InfA₁ (3.963 Da), esta cepa secreta, al menos, cinco péptidos antimicrobianos sin actividad frente a *S. pneumoniae*: InfB₁, InfB₂, InfC₁, InfG₁, y, por último, un péptido cuya

masa molecular (3.354 Da) coincide con la esperada para InfA₁ (3.357 Da). En consecuencia, la actividad antineumocócica de *S. infantarius* LP90 podría ser debida a InfA₁ modificada (3.963 Da) y/o a la acción sinérgica de InfA₁ (3.357 Da) e InfA₂, que, por lo tanto, constituirían el sistema de dos péptidos denominado InfA. En el Capítulo V se describe la producción heteróloga de InfA₁ e InfA₂, independiente y/o conjuntamente, por *Pichia pastoris* y *Lactococcus lactis*. La evaluación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas purificadas de las cepas recombinantes *Pc. pastoris* X-33-A₁ y *L. lactis* NZ9000-IA₁, y *Pc. pastoris* X-33-A₂ y *L. lactis* NZ9000-IA₂, que incluyen los genes que codifican los péptidos InfA₁ e InfA₂, respectivamente, así como de *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂, que incluye los genes que codifican ambos péptidos, reveló que InfA₁ e InfA₂ combinadas (ratio 1:1) ejercen un efecto antineumocócico sinérgico. Por lo tanto, estos resultados confirman que InfA es una nueva bacteriocina antineumocócica perteneciente a la subclase IIb (sistema de dos péptidos) constituida por InfA₁ e InfA₂. Por último, en el Capítulo VI se describe la evaluación de la actividad antimicrobiana y el modo de acción de InfA (InfA₁-InfA₂; ratio 1:1) frente a *S. pneumoniae* en caldo de cultivo (BHI), saliva humana y un sistema modelo de *biofilm*. Los resultados obtenidos revelaron que InfA (InfA₁-InfA₂) ejerce un potente efecto bactericida frente a *S. pneumoniae* en caldo de cultivo y en saliva humana, lo que demuestra la funcionalidad de esta bacteriocina en este fluido biológico. Asimismo, InfA (InfA₁-InfA₂) ejerció actividad antineumocócica en *biofilms* de *S. pneumoniae*. Finalmente, el análisis del efecto de InfA (InfA₁-InfA₂) sobre la microbiota de la saliva humana reveló una rápida reducción de la población anaeróbica, incluyendo un marcado descenso de especies estreptocócicas, así como un incremento de la población de *Staphylococcus aureus*. Considerados globalmente, los resultados de este trabajo de investigación ponen de manifiesto la utilidad de la bacteriocina antineumocócica InfA (InfA₁-InfA₂) como ingrediente activo de preparaciones farmacéuticas orales en el contexto de una estrategia alternativa o complementaria a los antibióticos para el control de las infecciones neumocócicas en humanos.

ABSTRACT

This research work focused on the evaluation of the potential application of lactic acid bacteria, mainly of food origin, and/or their bacteriocins as an alternative or complementary strategy to antibiotics for the control of infections caused by *Streptococcus pneumoniae* in humans by using microbiological, biochemical and genetic techniques. Chapter III describes the evaluation of the antimicrobial activity of 38 bacteriocinogenic LAB against clinical isolates of *S. pneumoniae*, with different serotypes and antimicrobial resistance profiles to the antibiotics most commonly used in human medicine, by using microbial antagonism assays (*i. e.*, stab-on-agar test [SOAT], agar well-diffusion test [ADT] and microtiter plate assay [MPA]). *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* LP90, a strain isolated from Venezuelan water-buffalo milk, was selected for further characterization due to its broad and strong antimicrobial spectrum against *S. pneumoniae*. Purification of the bacteriocins produced by *S. infantarius* LP90 by a multi-chromatographic procedure, as well as MALDI-TOF mass spectrometry analysis, allowed to determine that the anti-pneumococcal activity of this strain is due to the production of, at least, a novel bacteriocin with a molecular mass of 3,963 Da, which was termed infantaricin A (InfA). Comparison of the 19 N-terminal amino acids of InfA, obtained by N-terminal Edman-degradation, with those present at Genbank database revealed a high homology to an hypothetical protein of *S. infantarius* ATCCBAA-102. Chapter IV reports the genetic and transcriptional analysis of a 17,730-bp multibacteriocinogenic cluster of *S. infantarius* LP90, as well as the identification of the secreted bacteriocins by their purification to homogeneity and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Computer analysis of the nucleotide sequence obtained by the polymerase chain reaction (PCR) revealed the presence of: (i) 12 genes encoding 7 hypothetical bacteriocins, namely 5 two-peptide bacteriocin systems (subclass IIb): InfA (InfA₁-InfA₂), infantaricin B (InfB₁-InfB₂), infantaricin C (InfC₁-InfC₂), infantaricin D (InfD₁-InfD₂) and infantaricin G (InfG₁-InfG₂) and two one-peptide bacteriocins termed infantaricin E and infantaricin F, and (ii) 17 genes encoding proteins involved in the secretion, immunity and regulation of bacteriocin production. According to the predicted molecular mass of InfA₁ (3,357 Da), InfA purified from *S. infantarius* LP90 shows a molecular mass approximately 600 Da higher (3,963 Da). Transcriptional analysis of the multibacteriocinogenic cluster by one-step reverse transcription (RT)-PCR revealed that all the genes, except those involved in the regulation of bacteriocin production, are transcribed. Moreover, MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the peptides purified from *S. infantarius* LP90 by different multi-chromatographic procedures revealed that, in addition to the anti-pneumococcal bacteriocin InfA₁ (3,963 Da), this strain secretes, at least, five antimicrobial peptides lacking antimicrobial activity against *S. pneumoniae*: InfB₁, InfB₂, InfC₁ and InfG₁, as well as a peptide with a molecular mass (3,354 Da) matching that predicted for InfA₁ (3,357 Da). Therefore, the anti-pneumococcal activity of *S. infantarius* LP90 could be due to modified InfA₁ (3,963 Da) and/or to the synergistic effect of InfA₁ (3,357 Da) and InfA₂, which would constitute the two-peptide bacteriocin system termed InfA. Chapter V deals with the heterologous production of InfA₁ and InfA₂, independently and/or together, by *Pichia*

pastoris and *Lactococcus lactis*. Evaluation of the antimicrobial activity of the bacteriocins purified from the recombinant strains *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *L. lactis* NZ9000-IA₁, and *Pc. pastoris* X-33-A₂ and *L. lactis* NZ9000-IA₂, including the genes encoding the peptides InfA₁ and InfA₂, respectively, as well as from *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂, containing the genes encoding both peptides, revealed that InfA₁ and InfA₂ combined (ratio 1:1) exert an anti-pneumococcal synergistic effect. Therefore, these results confirm that InfA is a novel anti-pneumococcal bacteriocin belonging to the subclass IIb (two-peptide bacteriocin system) constituted by InfA₁ and InfA₂. Chapter VI describes the evaluation of the antimicrobial activity and mode of action of InfA (InfA₁-InfA₂; ratio 1:1) against *S. pneumoniae* in broth (BHI), human saliva and a biofilm model system. The results obtained revealed that InfA (InfA₁-InfA₂) exerts a strong bactericidal effect against *S. pneumoniae* in broth and human saliva, which demonstrates the functionality of this bacteriocin in this biological fluid. Likewise, InfA (InfA₁-InfA₂) exerted antimicrobial activity on *S. pneumoniae* biofilms. Finally, analysis of the effect of InfA (InfA₁-InfA₂) on human saliva microbiota revealed a rapid reduction in the anaerobic population, including a marked decrease in streptococci, as well as an increase in *Staphylococcus aureus* population. Taken together, the results of this research work show the usefulness of the anti-pneumococcal bacteriocin InfA (InfA₁-InfA₂) as an active ingredient for oral pharmaceutical preparations intended to be used as an alternative or complementary strategy to antibiotherapy for the control of human pneumococcal infections.

CAPÍTULO I

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS

Streptococcus pneumoniae, también denominado neumococo, es uno de los patógenos más importantes para el ser humano. Este microorganismo constituye el principal agente etiológico de enfermedades tales como la otitis media aguda, la sinusitis y la neumonía, así como de importantes infecciones invasivas, como la bacteriemia y la meningitis, caracterizadas por una elevada morbilidad y mortalidad, tanto en países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo. El desarrollo de vacunas frente a este patógeno constituye una estrategia de control fundamental para paliar la problemática de la propagación de las cepas más virulentas. Sin embargo, diversos estudios realizados tras la instauración de programas vacunales en distintos países han puesto de manifiesto las siguientes limitaciones: (i) elevado coste de producción y acceso limitado a las vacunas en los países en vías de desarrollo; (ii) necesidad de diferentes formulaciones, dosis y combinación de serotipos atendiendo a la diversidad poblacional, la edad y el área geográfica; (iii) aumento paralelo de aislados clínicos pertenecientes a serotipos no incluidos en las vacunas, que habrían pasado a ocupar el nicho ecológico de los desplazados por la aplicación de las mismas, y (iv) problemas relacionados con el desarrollo de tolerancia inducida por el *carrier*. En consecuencia, la antibioterapia constituye actualmente una estrategia complementaria a la vacunación de gran relevancia para el abordaje de la problemática relacionada con *S. pneumoniae*. Sin embargo, el tratamiento antibiótico suele ir asociado a la aparición de disbiosis y su empleo inadecuado ha provocado la diseminación de poblaciones bacterianas resistentes, lo cual representa un importante problema de salud pública. A este respecto, en las últimas décadas se ha incrementado notablemente la preocupación como consecuencia de la emergencia global de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a diversos antibióticos, principalmente β -lactámicos y macrólidos, así como por el incremento del número de aislados clínicos que presentan múltiples resistencias (a tres o más familias de antibióticos). En este contexto, las cepas de *S. pneumoniae* aisladas de otitis medias en niños, grupo poblacional que constituye el principal reservorio de esta especie y la fuente de contagio más importante para los adultos, son las que presentan una mayor tasa de resistencias. Además, conviene destacar que esta enfermedad es responsable de la mayoría de las visitas de los niños menores de 2 años a los centros de atención primaria y constituye la principal causa de prescripción de antibióticos para este sector de la población.

Por lo tanto, resulta imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias alternativas o complementarias a la quimioterapia antimicrobiana para el tratamiento de las infecciones humanas producidas por *S. pneumoniae*. A este respecto, en los últimos años se han realizado numerosos estudios que demuestran la eficacia de las bacterias lácticas (BAL) productoras de bacteriocinas (*i.e.*, bacteriocinogénicas) y/o sus bacteriocinas como estrategia alternativa o complementaria al tratamiento con antibióticos de diversas infecciones de relevancia clínica. En este sentido, las bacteriocinas se definen como péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal con actividad bactericida y/o bacteriostática frente a diversas bacterias patógenas. Entre las características que justifican la elección de las BAL como alternativa o complemento terapéutico a los antibióticos cabe destacar que estos microorganismos: (i) forman parte de la

microbiota comensal del tracto gastrointestinal y urogenital y de las mucosas de los animales y humanos; (ii) la mayoría de las especies poseen el *estatus* QPS (del inglés *Qualified Presumption of Safety*), por lo que se consideran seguros para los humanos, animales y medio ambiente, pudiendo, por tanto, emplearse como probióticos una vez establecida la seguridad y eficacia de la cepa concreta, y (iii) pueden ejercer diversos mecanismos de antagonismo microbiano, entre los que destaca la producción de bacteriocinas, que podrían utilizarse purificadas o parcialmente purificadas como ingredientes activos de preparaciones farmacéuticas. De forma general, estas sustancias antimicrobianas se caracterizan por presentar dianas de acción diferentes a las de los antibióticos, por lo que los fenómenos de resistencia cruzada entre ambos tipos de antimicrobianos resultan muy improbables. Asimismo, las bacteriocinas se inactivan por la acción de enzimas proteolíticas, incluidas las de origen gástrico (pepsina) y pancreático (tripsina y quimiotripsina), por lo que una vez ejercido su efecto antimicrobiano localmente se degradarían en el tracto gastrointestinal y no alcanzarían el torrente circulatorio o la luz intestinal de forma activa y, por lo tanto, a diferencia de los antibióticos, no provocarían disbiosis. Además, las bacteriocinas no son tóxicas ni inmunógenas en animales de experimentación. Las características mencionadas anteriormente sugieren que las bacteriocinas podrían emplearse de una forma segura como estrategia alternativa o complementaria a la quimioterapia en medicina humana y veterinaria.

Con base en lo expuesto anteriormente, los objetivos globales de este trabajo de investigación fueron los siguientes: (i) selección de cepas con actividad antimicrobiana frente a aislados clínicos de *S. pneumoniae* a partir de una colección de BAL aisladas previamente de distintos orígenes, principalmente alimentario; (ii) evaluación de la seguridad *in vitro* de la(s) cepa(s) antineumocócica(s) seleccionada(s) y determinación de la presencia en las mismas de los genes que codifican bacteriocinas descritas previamente; (iii) caracterización bioquímica y genética de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) producida(s) por la(s) cepa(s) con un mayor y más potente espectro de acción antineumocócico; (iv) producción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) seleccionada(s) por *Pichia pastoris* y *Lactococcus lactis*, y, por último, (v) determinación del modo de acción *in vitro* de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) seleccionada(s) frente a *S. pneumoniae*. Para lograr estos objetivos globales, se procedió al desarrollo de los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de una colección de BAL, aisladas previamente de diversos sustratos alimentarios (embutidos crudos curados, leche y productos lácteos, pescado y productos de la pesca), canales y heces de patos y palomas, y muestras clínicas humanas, frente a aislados clínicos de *S. pneumoniae* de diversos serotipos y patrones de susceptibilidad a los antibióticos más empleados en medicina humana y selección de las cepas con actividad antineumocócica.
2. Identificación y filiación taxonómica de la(s) BAL antineumocócica(s) seleccionadas.

3. Evaluación de la seguridad *in vitro* de la(s) BAL antineumocócica(s) seleccionada(s) y determinación de la presencia de genes de bacteriocinas ya descritas.
 - 3.1. Evaluación fenotípica de la susceptibilidad a diversos antibióticos empleados en medicina humana.
 - 3.2. Evaluación fenotípica y/o genética de la presencia de factores de virulencia descritos en los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*.
 - 3.3. Evaluación fenotípica y genética de la producción de aminas biógenas.
 - 3.4. Evaluación de la presencia de diversas actividades enzimáticas.
 - 3.5. Evaluación de la presencia de actividad mucinolítica.
 - 3.6. Evaluación de la capacidad de desconjugación de sales biliares.
 - 3.7. Evaluación de la presencia de genes estructurales que codifican bacteriocinas descritas previamente en los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*
4. Caracterización bioquímica y genética de la(s) bacteriocinas seleccionada(s) por su espectro de acción antineumocócico.
 - 4.1. Purificación a homogeneidad de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) y determinación de su masa molecular.
 - 4.2. Determinación de la secuencia aminoácida de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) purificada(s).
 - 4.3. Caracterización genética del *cluster* responsable de la producción de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s).
 - 4.4. Análisis transcripcional de los genes del *cluster* de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s).
5. Producción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) seleccionada(s) por *Pc. pastoris* y *L. lactis*.
 - 5.1. Clonación de los genes de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) seleccionada(s) en vectores de expresión funcionales en *Pc. pastoris* o *L. lactis* y transformación de los plásmidos recombinantes en células competentes de estas especies.
 - 5.2. Detección y cuantificación biológica de la producción de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) en los sobrenadantes de las cepas recombinantes de *Pc. pastoris* y *L. lactis*.
 - 5.3. Purificación a homogeneidad de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) producida(s) heterológamente y determinación de su masa molecular.

6. Determinación del modo de acción *in vitro* de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) seleccionada(s) purificadas a homogeneidad o sintetizada(s) químicamente.
 - 6.1. Evaluación del efecto inhibidor de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) en el desarrollo de *S. pneumoniae* en caldo de cultivo.
 - 6.2. Evaluación del efecto inhibidor de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) en el desarrollo de *S. pneumoniae* en *biofilms*.
 - 6.3. Determinación de la estabilidad funcional y el modo de acción de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) en saliva humana.
 - 6.4. Análisis del efecto de la(s) bacteriocina(s) antineumocócica(s) sobre la microbiota de la saliva humana.

CHAPTER I

GENERAL ACCOUNT OF THE RESEARCH
SUBJECT: OBJECTIVES

Streptococcus pneumoniae, also known as pneumococcus, is regarded as one of the most important human pathogens. This microorganism is the etiological agent of diseases such as acute otitis media, sinusitis and pneumonia, as well as of potentially life-threatening invasive infections, such as bacteremia and meningitis, which constitute the major causes of morbidity and mortality worldwide. The development of vaccines against this pathogen is a fundamental control strategy which could alleviate the problems related to the spreading of the most virulent strains. Nevertheless, several studies performed after the establishment of vaccination programs in different countries have revealed the following drawbacks: (i) high cost of production and limited access to vaccines in developing countries; (ii) need of different formulations, doses and combination of serotypes according to the diversity of population, age and geography area; (iii) a parallel increase in the isolation of non-vaccine serotypes from clinical samples, which would have occupied the ecological niches left by vaccine-serotypes, and (iv) problems related to the development of tolerance induced by the carrier. As a consequence, antibiotherapy currently constitutes a fundamental complementary strategy to vaccination to address the medical problems related to *S. pneumoniae*. However, treatments with antibiotics are usually related to dysbiosis and its inadequate use has provoked the spreading of antibiotic-resistant bacteria, which represents a public health issue. In this respect, the concerns about the worldwide emergence of antimicrobial resistant *S. pneumoniae* strains, mainly against β -lactams and macrolides, as well as the increase of clinical isolates showing multidrug-resistances (to three or more drug families) has increased during the last decades. In this context, *S. pneumoniae* isolates from acute otitis media in children, who act as the main reservoir of this species and the major source for adult infections, are those displaying higher antimicrobial resistance rates. Moreover, it should be noted that this disease accounts for a high proportion of the visits of children before age 2 to primary health care centers and is also the main cause of antibiotic prescription in this group.

Therefore, there is a need for the development of new alternative or complementary strategies to the antimicrobial chemotherapy for treatment of the human infections caused by *S. pneumoniae*. With regard to this, several studies have proved the efficacy of bacteriocin-producing (*i.e.*, bacteriocinogenic) lactic acid bacteria (LAB) and/or their bacteriocins as an alternative or complementary strategy to the traditional antibiotic therapy for treatment of clinically relevant infections. In this context, bacteriocins are ribosomally-synthesized antimicrobial peptides with bactericidal and/or bacteriostatic activity against different pathogenic bacteria. Amongst the characteristics which would support the use of LAB as an alternative or complement to antibiotics the following features may be highlighted: (i) they are part of the commensal microbiota of the gastrointestinal and urogenital tracts and mucous membranes of humans and animals; (ii) most of the species included in this group are granted QPS status (Qualified Presumption of Safety), which implies that they are considered safe for humans, animals, and the environment, and that they could be used as probiotics once the safety and efficacy of a certain strain has been proven, and (iii) they have different mechanisms of

microbial antagonism, such as bacteriocins, which could be used purified or partially purified as active ingredients of pharmaceutical preparations. These antimicrobial compounds are generally characterized by showing targets different to that used for antibiotics to exert their inhibitory activity and thus cross-resistance phenomena between them are expected to occur rarely. Likewise, due to their proteinaceous nature, they can be inactivated by gastric (pepsin) and pancreatic (trypsin and chymotrypsin) proteolytic enzymes, thus after exerting their local antimicrobial effect would be degraded into the gastrointestinal tract preventing their distribution to other body compartments and therefore the risk of originating dysbiosis, which is generally associated to antibiotherapy. Moreover, bacteriocins are not toxic or immunogenic in laboratory animals. All these characteristics warrant the safe use of bacteriocins as an alternative or complementary strategy to the antimicrobial chemotherapy in human and veterinary medicine.

Based on the information given above, the main goals of the present research work were the following: (i) selection of the strains showing antimicrobial activity against clinical isolates of *S. pneumoniae* from a collection of LAB previously isolated from different sources, mainly food and food products; (ii) assessment of the *in vitro* safety of the selected anti-pneumococcal strain(s) and evaluation of the presence of known bacteriocin genes; (iii) biochemical and genetic characterization of the anti-pneumococcal bacteriocin(s) produced by the strain(s) with a wider and stronger anti-pneumococcal spectrum; (iv) heterologous production of the selected anti-pneumococcal bacteriocin(s) by *Pichia pastoris* and *Lactococcus lactis*, and (v) determination of the *in vitro* mode of action of the selected anti-pneumococcal bacteriocin(s) against *S. pneumoniae*. In order to achieve these goals, the following partial objectives were addressed:

1. Evaluation of the antimicrobial activity of a collection of LAB previously isolated from several food sources (dry-fermented sausages, milk and milk products, and fish and fish products), meat and feces from ducks and pigeons, and human clinical isolates, against clinical isolates of *S. pneumoniae* with different serotypes and antimicrobial resistance profiles to the antibiotics most commonly used in human medicine, and selection of the strains showing anti-pneumococcal activity.
2. Taxonomic identification of the selected anti-pneumococcal LAB.
3. *In vitro* safety evaluation of the selected bacteriocinogenic anti-pneumococcal LAB and determination of the presence of known bacteriocin genes.
 - 3.1. Phenotypic evaluation of the susceptibility to several antibiotics used in human medicine.
 - 3.2. Phenotypic and genetic detection of known streptococcal and enterococcal virulence factors.
 - 3.3. Phenotypic and genetic evaluation of biogenic amine production.

- 3.4. Evaluation of the presence of different enzymatic activities.
- 3.5. Evaluation of mucin degradation ability.
- 3.6. Evaluation of bile salt deconjugation.
- 3.7. Evaluation of the presence of bacteriocin structural genes previously described in streptococci and enterococci.
4. Biochemical and genetic characterization of the anti-pneumococcal bacteriocin(s) selected by its/their anti-pneumococcal spectrum.
 - 4.1. Purification to homogeneity of the anti-pneumococcal bacteriocin(s) and determination of its/their molecular mass(es).
 - 4.2. Determination of the amino acid sequence of the anti-pneumococcal bacteriocin(s).
 - 4.3. Genetic characterization of the cluster responsible for the production of the anti-pneumococcal bacteriocin(s).
 - 4.4. Transcriptional analysis of the genes included into the anti-pneumococcal bacteriocin(s) cluster.
5. Heterologous production of the selected anti-pneumococcal bacteriocin(s) by *Pc. pastoris* and *L. lactis*.
 - 5.1. Cloning of the genes of the selected anti-pneumococcal bacteriocin(s) in expression vectors for *Pc. pastoris* and *L. lactis* and transformation of the recombinant plasmids into competent cells of these species.
 - 5.2. Detection and quantification of the anti-pneumococcal bacteriocin(s) production by *Pc.pastoris* and *L. lactis* in the supernatants of the recombinant strains.
 - 5.3. Purification to homogeneity of the heterologously produced anti-pneumococcal bacteriocin(s) and determination of its/their molecular mass(es) .
6. Determination of the *in vitro* mode of action of the selected anti-pneumococcal bacteriocin(s) previously purified to homogeneity or chemically synthesized.
 - 6.1. Evaluation of the inhibitory effect of the anti-pneumococcal bacteriocin(s) on *S. pneumoniae* in broth.
 - 6.2. Evaluation of the inhibitory effect of the anti-pneumococcal bacteriocin(s) on *S. pneumoniae* biofilms.
 - 6.3. Determination of the functional stability and mode of action of the anti-pneumococcal bacteriocin(s) in human saliva.
 - 6.4. Analysis of the effect of the anti-pneumococcal bacteriocin(s) on human saliva microbiota.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

II.1. BACTERIAS LÁCTICAS

II.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico, fisiológico y ecológico que se engloba dentro del grupo clostridial de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C <55 mol%) y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como metabolito mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono. En general, las bacterias lácticas son microorganismos de morfología cocoide, bacilar o cocobacilar, no esporulados, catalasa-negativos, microaerófilos o anaerobios facultativos, ácido-tolerantes, carentes de citocromos y con un metabolismo fermentativo (Stiles y Holzapfel, 1997; Cintas *et al.*, 2000c; Carr *et al.*, 2002; Von Wright y Axelsson, 2012).

Los géneros bacterianos comprendidos en el grupo de las bacterias lácticas se engloban dentro de la familia *Lactobacillales*, el orden *Bacilli* y el filo *Firmicutes* y son actualmente los siguientes: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Pot *et al.*, 1994; Stiles y Holzapfel, 1997; Cintas *et al.*, 2000c, 2001; Claesson *et al.*, 2007; Ogier y Serron, 2008; Ogier *et al.*, 2008; De Vos *et al.*, 2009). Tradicionalmente, también se consideraba al género *Bifidobacterium* dentro de las bacterias lácticas debido a que posee las características morfológicas y fisiológicas de este grupo microbiano; no obstante, las bifidobacterias están más relacionadas filogenéticamente con el grupo actinomiceto de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C >55 mol%) y, además, poseen una ruta específica de fermentación de los azúcares, catalizada por la enzima fructosa-6-fosfato fosfoetolasa, lo que las separa claramente del grupo de las bacterias lácticas (Axelsson *et al.*, 1998).

Las bacterias lácticas se localizan en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de hidratos de carbono solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno, tales como la leche y los productos lácteos fermentados, la carne y los productos cárnicos fermentados, el pescado y los derivados de la pesca, las frutas y hortalizas frescas y los productos vegetales fermentados, los ensilados y diversas bebidas. Asimismo, estos microorganismos también forman parte de la microbiota asociada a las mucosas de los mamíferos y otros animales y se han aislado del suelo, estiércol y aguas residuales (Holzapfel *et al.*, 2001; Carr *et al.*, 2002; Von Wright y Axelsson, 2012; Kostic *et al.*, 2013).

II.1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y/o patógenos presentes potencialmente en los alimentos. El efecto antimicrobiano primario de las bacterias lácticas se debe a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la formación de ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético, principalmente), con el consiguiente descenso del pH. No obstante, las bacterias lácticas también producen otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D de los aminoácidos, reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Lücke, 2000; Cintas *et al.*, 2000a, b, 2001; Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2012). De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente para la bioconservación de los alimentos (sección II.2.2.7.2.1), ya que por su naturaleza proteica podrían ser degradadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal mientras que permanecerían activas en los sustratos alimenticios y, además, no parecen ser tóxicas ni inmunógenas (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996, Cintas *et al.*, 2000b). Asimismo, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente a microorganismos patógenos que afectan a las personas y/o a los animales resulta de interés para la industria farmacéutica debido a su potencial empleo como estrategia complementaria o alternativa a la terapia con antibióticos en medicina humana y veterinaria (sección II.2.2.7.1).

II.1.3. APLICACIONES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA ALIMENTACIÓN Y LA SALUD HUMANA Y ANIMAL

II.1.3.1. BACTERIAS LÁCTICAS EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS FERMENTADOS

Los alimentos fermentados, consumidos por la humanidad desde tiempos inmemoriales, parecen tener su origen en la civilización sumeria (5.000–4.000 a.C.). Tradicionalmente, estos alimentos se elaboraban mediante procesos empíricos basados en la actividad de la microbiota presente de forma natural en las materias primas (fermentaciones naturales) (Cintas y Casaus, 1998). Sin embargo, en la actualidad, la mayoría de los productos fermentados se obtienen mediante procesos industriales estrictamente controlados basados en la adición deliberada a la materia prima de cultivos de microorganismos específicos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) (cultivos iniciadores) (Tabla II.1), lo que permite garantizar y estandarizar las características organolépticas y reológicas del producto final, así como potenciar su calidad higiénico-sanitaria y alargar su vida útil (Cintas y Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 2000a).

Tabla II.1. Microorganismos adicionados durante las fermentaciones industriales como cultivos iniciadores, protectores y/o adjuntos

Producto	Microorganismos	Sustrato
Bebidas		
Cerveza y vino	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y bacterias lácticas	Cereales, lúpulo y uvas
<i>Mahewu</i> (Sudáfrica)	Bacterias lácticas	Maíz
Carne		
Embutidos fermentados	Bacterias: <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Pediococcus</i> spp., <i>Streptococcus carnosus</i> y <i>Micrococcus varians</i> Levaduras: <i>Debaryomyces hansenii</i> y <i>Candida famata</i> Mohos: <i>Penicillium nalgiovense</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	Carne de ternera y de cerdo
Cereales		
Pan	<i>Sc. cerevisiae</i> y bacterias lácticas <i>Torulopsis</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Trichosporon pullulans</i> y bacterias lácticas <i>Sc. cerevisiae</i> y bacterias lácticas Bacterias lácticas, hongos y levaduras	Trigo, centeno y otros cereales Arroz y lentejas Harina de trigo Maíz
Leche		
Queso	Bacterias: <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Propionibacterium</i> spp. Mohos (<i>Penicillium roqueforti</i> en quesos azules) y levaduras	Leche
Yogur	<i>S. thermophilus</i> y <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	Leche
Kéfir	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> y <i>Torulla</i> spp.	Leche
Leche acidófila	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	Leche
Pescado	<i>C. piscicola</i> y <i>Carnobacterium divergens</i>	Pescado
<i>Plasom</i> (Tailandia)		Pescado
Postres		
<i>Bongkre</i> (Indonesia)	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Coco
<i>Oncom</i> (Indonesia)	<i>Neurospora intermedia</i> o <i>R. oligosporus</i>	Cacahuete
Vegetales		
Salsa de soja	<i>Aspergillus oryzae</i> soyae, <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Zigosaccharomyces rouxii</i>	Haba de soja y trigo
<i>Sauerkraut</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>L. lactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Col, repollo
<i>Gari</i> (África)	<i>Corynebacterium manihot</i> y bacterias lácticas	Raíz de cassava
<i>Kimchi</i> (Korea)	Bacterias lácticas	Col, repollo
<i>Tempeh</i> (Indonesia)	<i>R. oligosporus</i>	Haba de soja
Encurtidos	<i>Pediococcus cerevisiae</i> y <i>Lb. plantarum</i> <i>Le. mesenteroides</i> y <i>Lb. plantarum</i>	Pepinillo en vinagre Aceitunas

Adaptado de Caplice y Fitzgerald (1999) y Ross et al. (2002).

Los microorganismos que se añaden a las materias primas para la obtención de alimentos fermentados pueden clasificarse en función de su finalidad principal en: (i) cultivos iniciadores, que se adicionan para inducir cambios en la textura, aroma, sabor, color, digestibilidad y palatabilidad de las materias primas, permitiendo así la obtención de productos finales con unas características organolépticas y reológicas deseables (Stiles, 1996; Lücke, 2000; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Tamine, 2002; Leroy y de Vuyst, 2004; Smit *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2006); (ii) cultivos protectores, adicionados para garantizar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, así como para incrementar su vida útil mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos debido a la competencia por los nutrientes del

sustrato y la producción de diversos metabolitos (Geisen y Holzapfel, 1996; Lücke, 2000; Rodgers, 2001; Rodgers *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002; Työppönen *et al.*, 2003; Vermeiren *et al.*, 2004), y (iii) cultivos adjuntos, adicionados con una finalidad distinta a las anteriores, como, por ejemplo, la aceleración de la maduración mediante la lisis celular de los cultivos iniciadores durante la elaboración de determinados tipos de quesos, la producción del sabor y aroma deseado o el aporte de beneficios adicionales para la salud del consumidor (*e.g.*, propiedades probióticas y producción de péptidos bioactivos) (O’Sullivan *et al.*, 2002a; Settani y Moschetti, 2010).

Existe una amplísima variedad de alimentos fermentados elaborados a partir de materias primas como la leche, vegetales, raíces, cereales, carne y pescado (Tabla II.1) (Stiles, 1996; Caplice y Fitzgerald, 1999; Lücke, 2000; Ross *et al.*, 2002; Park y Kim, 2012; Salovaara y Gänzle, 2012; Franz y Holzapfel, 2012). A pesar de que en los países industrializados la mayoría de los productos fermentados se obtienen mediante la adición intencionada de cultivos iniciadores a las materias primas y condiciones rigurosamente controladas, la elaboración de productos fermentados mediante métodos tradicionales continúa siendo una realidad en distintas regiones de África, Asia y América Latina. A diferencia de lo que ocurre en las fermentaciones industriales, la calidad y estabilidad de los productos así obtenidos es muy variable debido a la falta de estandarización del proceso, basado en fermentaciones espontáneas o la técnica *back-slopping*, consistente en el empleo de una masa parcialmente fermentada de un lote anterior para iniciar la fermentación de un nuevo lote del alimento (Mukisa *et al.*, 2012). Conviene destacar que las bacterias lácticas, especialmente especies de los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*, en ocasiones acompañadas por levaduras, también desempeñan un importante papel en la elaboración de estos productos tradicionales (Tabla II.2).

Tabla II.2. Productos alimenticios obtenidos mediante fermentación tradicional

Producto	Microorganismos	Sustrato	Referencia
Kule naoto (Kenia)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp. y <i>Leuconostoc</i> spp.	Leche cruda de vaca, cabra, oveja o camella	Mathara <i>et al.</i> (2004)
Suusac (Kenia)	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactococcus</i> <i>raffinolactis</i> y <i>Le. mesenteroides</i>	Leche de camella	Lore <i>et al.</i> (2005)
Hogormeg (Mongolia)	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>L. lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>bavaricus</i> , <i>Candida kefir</i> y <i>Sc. Cerevisiae</i>	Leche de camella	Shuangquan <i>et al.</i> (2004)
Gariss (Sudán)	<i>Lactococcus fermentum</i> y especies del grupo <i>Streptococcus bovis</i> , destacando <i>Streptococcus</i> <i>infantarius</i> subesp. <i>infantarius</i>	Leche de camella	Abdelgadir <i>et al.</i> (2008)
Roab (Sudán)	<i>Enterococcus</i> spp. y <i>Streptococcus</i> spp., destacando <i>S. infantarius</i> subesp. <i>infantarius</i>	Leche de vaca	Hamza <i>et al.</i> (2009)
Fènè (Mali)	<i>Enterococcus</i> spp. y <i>Streptococcus</i> spp., destacando <i>S. infantarius</i> subesp. <i>infantarius</i>	Leche de vaca	Wullschleger <i>et al.</i> (2009)
Kumis (Colombia)	<i>E. faecium</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>	Leche de vaca	Chaves-López <i>et al.</i> (2011)
Obusera (Uganda)	<i>Streptococcus gallolyticus</i> , <i>S. infantarius</i> subesp. <i>infantarius</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>L. lactis</i> <i>Le. lactis</i> y <i>Weissella confusa</i>	Cereales	Mukisa <i>et al.</i> (2012)

II.1.3.2. BACTERIAS LÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS

II.1.3.2.1. Definición y principales características de los probióticos

El término probiótico fue definido por Fuller (1989) como “microorganismos vivos que en forma de suplementos alimentarios afectan beneficiosamente al hospedador mediante una mejora de su equilibrio intestinal”. Actualmente, de acuerdo con la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization*) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) los probióticos se consideran microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador (FAO/WHO, 2002). La popularidad de los probióticos ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido tanto a su demanda por parte de la industria alimentaria para la elaboración de alimentos funcionales (principalmente yogur y otros derivados lácteos fermentados) como por representar una nueva estrategia profiláctica y terapéutica en medicina humana y veterinaria.

La obtención de cepas bacterianas para su empleo como probióticos se basa normalmente en el aislamiento inicial de microorganismos comensales de individuos sanos de la misma especie y en la selección posterior de los que cumplan parte o la totalidad de los siguientes requisitos: (i) tolerancia a bajos niveles de pH, al jugo gástrico y a las sales biliares; (ii) capacidad de adhesión a células intestinales y de inmunoestimulación; (iii) capacidad de colonización del tracto gastrointestinal; (iv) inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas o a través de mecanismos de exclusión competitiva; (v) seguridad e inocuidad (estabilidad genética y ausencia de patogenicidad, toxicidad, alergenicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad); (vi) ausencia de factores de virulencia y de resistencias adquiridas a antibióticos, y (vii) supervivencia, viabilidad y crecimiento durante la elaboración, transporte y almacenamiento y, en el caso de los que se adicionan a los alimentos funcionales, adecuada interacción con los cultivos iniciadores y/o sustancias prebióticas presentes en los mismos (Salminen *et al.*, 1996; Saarela *et al.*, 2000; Gardiner *et al.*, 2002; Martín, 2005; Gueimonde *et al.*, 2012).

Entre los numerosos efectos beneficiosos derivados del consumo de probióticos (con distintos grados de evidencia científica) se incluyen los siguientes: (i) disminución de la duración de las diarreas del viajero, de las secundarias al tratamiento con antibióticos y de las provocadas por rotavirus; (ii) mejora de la digestibilidad de la lactosa; (iii) control de *Helicobacter pylori*; (iv) mejora de la enfermedad inflamatoria intestinal; (v) control del síndrome de intestino irritable; (vi) reducción del riesgo de alergia en niños; (vii) disminución de las infecciones urogenitales; (viii) reducción del nivel de colesterol sanguíneo; (ix) disminución del riesgo de cáncer de colon; (x) efectos nutricionales (mejora en la absorción del calcio, aumento de la síntesis de vitaminas y mejora de la predigestión de proteínas); (xi) acción antihipertensiva; (xii) intervención en el desarrollo cognitivo, y (xiii) regulación del

estado de ánimo, ansiedad y salud mental (Nagpal *et al.* 2012; Kailasapathy, 2013). En cualquier caso, debe destacarse que el/los efecto/s beneficioso/s es/son específico/s de cada cepa, por lo que no se pueden generalizar a toda una especie ni a todo el grupo de las BAL, ni a otros grupos microbianos (*e.g.*, bifidobacterias, género *Bacillus*, *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) dentro de los que se han descrito cepas con propiedades probióticas.

Aunque los mecanismos de acción por los que los probióticos ejercen sus efectos beneficiosos no son bien conocidos, en el caso de la estabilización y/o reconstitución de la microbiota intestinal, la disminución del riesgo de padecer determinados tipos de cáncer y la mejora de la defensa frente a las infecciones se han propuesto los siguientes: (i) modulación del sistema inmune innato y adquirido, relacionada fundamentalmente con la prevención y el tratamiento de procesos infecciosos, así como con la mejora de la inflamación intestinal y, probablemente, con la eliminación de células neoplásicas; (ii) efecto antimicrobiano sobre microorganismos comensales y/o patógenos, de importancia en la prevención y el tratamiento de procesos infecciosos y en la restauración del equilibrio de la microbiota intestinal, y (iii) capacidad para interactuar con productos derivados de los microorganismos (*e.g.*, toxinas), el hospedador y los alimentos, vinculada a la inactivación de toxinas microbianas y a la destoxificación de componentes del hospedador y los alimentos en el intestino. A pesar de que los tres mecanismos mencionados pueden contribuir a que se produzcan cualquiera de estos efectos beneficiosos, conviene destacar que es poco probable que los tres puedan ser ejercidos por la misma cepa, por lo que la utilización de una única cepa no resulta adecuada para la prevención o el tratamiento de varios tipos de enfermedad, sino para una o algunas indicación/es específica/s para las que se haya determinado su utilidad (Oelschlaeger, 2010).

II.1.3.2.2. Evaluación de la seguridad de los probióticos

La seguridad de los probióticos es un aspecto importante que preocupa tanto a las autoridades competentes como a los consumidores (Franz *et al.*, 2010; Sanders *et al.*, 2010; Salminen y Von Wright, 2012). A este respecto, existen directrices internacionales para la evaluación de los probióticos empleados en los alimentos, como las que se reflejan en el documento denominado *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, preparado por una Comisión Conjunta de Expertos de la FAO y la OMS (FAO/WHO, 2002). En este documento se recogen las siguientes actividades a llevar a cabo durante el proceso de evaluación del microorganismo candidato a ser empleado como probiótico en un alimento: (1) identificación taxonómica mediante pruebas genotípicas y fenotípicas; (2) caracterización funcional mediante estudios *in vitro* y en animales; (3) evaluación de la seguridad *in vitro* y/o en animales y estudios en personas; entre los estudios de seguridad *in vitro* se incluyen la determinación de (i) su resistencia a antibióticos, (ii) la presencia de factores de virulencia o producción de toxinas, (iii) su capacidad para ejercer actividad hemolítica y (iv) la presencia de ciertas actividades metabólicas (*e.g.*, producción de D-lactato y desconjugación de la bilis); (4) determinación de su eficacia y, por último, (5) etiquetado, presentación y publicidad. Por otra parte, en Estados

Unidos (EE. UU.), los probióticos consumidos como alimentos o en forma de complementos alimenticios deben haber sido reconocidos como seguros, es decir, gozar del estatus GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe*) establecido por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) (Stevens y O'Brien Nabors, 2009; Bourdichon *et al.*, 2012). En la Unión Europea (UE), los microorganismos empleados en la elaboración de alimentos se consideran “ingredientes”, por lo que, según el Reglamento (CE) n° 178/2002, los responsables de las empresas alimentarias son los encargados de garantizar la seguridad de los mismos (Bourdichon *et al.*, 2012). En este contexto, la Federación Internacional de Productos Lácteos (IDF, del inglés *International Dairy Federation*) y la Asociación Europea de Cultivos para Alimentos y Piensos (EFFCA, del inglés *European Food and Feed Culture Association*) elaboraron un inventario de microorganismos empleados fundamentalmente en la elaboración de productos lácteos fermentados con una historia documentada de uso seguro que se convirtió en una referencia *de facto* para la utilización de cultivos en la industria alimentaria europea (Mogesen *et al.*, 2002a, 2002b). Este listado ha sido recientemente revisado y actualizado por Bourdichon *et al.* (2012) para incluir tanto microorganismos empleados en la elaboración de productos fermentados lácteos como en la fermentación de otros sustratos alimentarios (carne, pescado, cereales, etc.), entre los que se encuentran bacterias lácticas de los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Weissella*. Asimismo, en la UE existen diversos documentos elaborados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*) acerca de la evaluación de la seguridad de los microorganismos empleados en la alimentación humana y animal, entre los que se encuentran los probióticos. A este respecto, los ya extintos Comités Científicos de Alimentación Animal, de Alimentación Humana y de Evaluación de Plantas de la Comisión Europea introdujeron el concepto QPS (del inglés *Qualified Presumption of Safety*) como aproximación a la evaluación de la seguridad de los microorganismos empleados en alimentos y piensos (European Commission, 2003) que fue posteriormente adoptado por la EFSA como sistema genérico para la evaluación de la seguridad de los microorganismos introducidos deliberadamente en la cadena alimentaria (EFSA 2005a,b; 2007). De acuerdo con este sistema, la asignación del calificativo QPS a una unidad taxonómica definida (*e.g.*, un género o grupo de especies relacionadas) por la EFSA se establece principalmente con base en cuatro pilares: (i) establecimiento de la identidad taxonómica; (ii) cuerpo de conocimiento (es decir, si existe el conocimiento suficiente como para tomar una decisión acerca de su seguridad, lo que incluye la existencia de datos acerca de su historia de uso, aplicaciones industriales y aspectos clínicos, de literatura científica, etc.); (iii) posible patogenicidad (es decir, si el grupo considerado contiene patógenos conocidos y, en caso positivo, si existe suficiente conocimiento acerca de sus determinantes de virulencia para poder excluir las cepas patógenas), y (iv) forma final de empleo (lo que se refiere a la entrada o no de microorganismos viables en la cadena alimentaria) (EFSA, 2005a). En el caso de que para una unidad taxonómica determinada no

exista preocupación acerca de su seguridad, o de que exista pero pueda definirse y excluirse (quedando definida en la “cualificación” que debe satisfacerse para considerarla como segura), la EFSA le asignará el estatus QPS, de forma que cualquier cepa cuya identidad pueda determinarse de forma no ambigua y pertenezca a un grupo con este estatus estará libre de la necesidad de someterse a una evaluación completa de su seguridad y deberá únicamente satisfacer la/s cualificación/es que le correspondan (por ejemplo, en el caso de las bacterias lácticas con estatus QPS, la única cualificación que se establece es la ausencia de determinantes genéticos transmisibles de resistencia a antibióticos) (EFSA, 2008, 2012c). Conviene destacar que aquellos microorganismos pertenecientes a grupos a los que no se les haya asignado el estatus QPS no quedan excluidos de su posible empleo en la cadena alimentaria, pero deberán someterse a una evaluación completa de su seguridad. En este sentido, en el caso concreto de la evaluación de la seguridad de cepas de *Enterococcus faecium* candidatas a ser empleadas en nutrición animal, la EFSA ha elaborado un documento guía en el que establece que debe llevarse a cabo la determinación de su susceptibilidad a la ampicilina (concentración inhibidora mínima ≤ 2 mg/ml) y de la ausencia de tres marcadores genéticos (los genes que codifican la proteína de superficie enterococal Esp [del inglés *Enterococcal surface protein*]), una putativa glicosil hidrolasa previamente anotada como una hialuronidasa [Hyl_{Efm}] y la secuencia de inserción IS16) con el fin de excluir las cepas de origen clínico de dicho empleo (EFSA, 2012b). Asimismo, existen otras recomendaciones en la literatura científica para la evaluación de la seguridad del empleo de microorganismos del género *Enterococcus* en la elaboración de alimentos (Ogier y Serror, 2008; Franz *et al.*, 2011).

En definitiva, la aproximación establecida por la EFSA permite realizar una evaluación de la seguridad de los microorganismos empleados en la cadena alimentaria transparente y consistente y con el mismo grado de confianza acerca de la “certeza razonable de la ausencia de daño” que el sistema de evaluación “caso a caso”, así como focalizar los recursos en la evaluación de la seguridad de aquellos microorganismos para los que existan más riesgos o incertidumbres (EFSA, 2005a). En el año 2007, la EFSA publicó la lista de unidades taxonómicas propuestas para el estatus QPS, con la recomendación de que esta se revisara, al menos, anualmente, de tal modo que, incluso cuando no existan cambios, se especifique claramente que se mantiene el estatus QPS de las unidades propuestas (EFSA, 2007). Las especies de bacterias lácticas con estatus QPS propuestas en la última revisión de la lista de agentes biológicos añadidos deliberadamente a los alimentos y piensos se muestra en la Tabla II.3 (EFSA, 2014).

II.1.3.2.3. Bacterias lácticas como probióticos en personas

Existen dos vías principales para introducir células vivas con efecto probiótico en el organismo humano: (i) los alimentos, ya que de forma natural o añadidos intencionadamente los probióticos se pueden encontrar en productos lácteos fermentados, vegetales fermentados, productos cárnicos y pescados fermentados y bebidas alcohólicas artesanales; en este sentido,

Tabla II.3. Bacterias lácticas con estatus QPS^{a,b}

Género <i>Lactobacillus</i>		
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lactobacillus panis</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lb. plantarum</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	<i>Lb. sakei</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lb. kefir</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
Género <i>Lactococcus</i>		
<i>L. lactis</i>		
Género <i>Leuconostoc</i>		
<i>Leuconostoc citreum</i>		
<i>Le. lactis</i>		
<i>Le. mesenteroides</i>		
Género <i>Oenococcus</i>		
<i>Oenococcus oeni</i>		
Género <i>Pediococcus</i>		
<i>Pediococcus acidilactici</i>		
<i>Pediococcus dextrinicus</i>		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
Género <i>Streptococcus</i>		
<i>S. thermophilus</i>		
Género <i>Carnobacterium</i>		
<i>C. divergens</i>		

^aEsta lista de microorganismos con estatus QPS, propuesta por la EFSA, se actualiza anualmente como consecuencia de las evaluaciones periódicas de seguridad. ^bPara todas las unidades taxonómicas bacterianas la condición genérica es que las cepas no deben albergar ningún gen de resistencia adquirida a antibióticos clínicamente relevantes; no obstante, para algunas de ellas se establecen, además, otro tipo de consideraciones. Fuente: EFSA (2014).

aunque las cepas utilizadas como cultivos iniciadores pueden tener cualidades probióticas, generalmente se consideran más apropiadas otras seleccionadas específicamente para este fin con base en su eficacia (*e.g.*, supervivencia al tránsito por el tracto gastrointestinal y capacidad de adhesión a las células intestinales), y (ii) los complementos alimenticios o medicamentos, que contienen una o más cepas probióticas que se administran como preparados farmacéuticos en forma de cápsulas, pastillas, polvos o gránulos (Holzapfel y Schillinger, 2002; Franz *et al.*, 2010; Gueimonde *et al.*, 2012; Gómez-Sala, 2013).

Con respecto a la primera vía para introducir probióticos en el organismo humano, en los últimos años, el aumento del interés de los consumidores por la relación entre la dieta y la salud ha impulsado el desarrollo y el consumo de alimentos orientados a compensar los desequilibrios alimentarios y garantizar las ingestas de nutrientes recomendadas (alimentos funcionales). Aunque no existe una definición completamente consensuada del concepto de alimento funcional, el documento “Conceptos Científicos sobre los Alimentos Funcionales en Europa” los define como aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo de manera

que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de padecer enfermedades. Asimismo, en este documento se establece que los alimentos funcionales deben consumirse en forma de alimentos (se excluyen por tanto los comprimidos, cápsulas o cualquier otra forma de complemento alimenticio), ejercer sus efectos beneficiosos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta y formar parte de una dieta normal (Diplock *et al.*, 1999; Ashwell, 2004). En este contexto, dentro de los alimentos funcionales, los productos que contienen microorganismos probióticos no solo son los más populares entre los consumidores, representando el prototipo de este tipo de alimentos, sino que, además, son los que gozan de mayor importancia económica dentro de este sector. A su vez, los productos lácteos son los más relevantes dentro de esta categoría, representando el 56% del mercado global de los alimentos funcionales, estimado en más de 31.000 millones de dólares en el año 2004 (Siró *et al.*, 2008). Los productos lácteos más comúnmente empleados para vehicular microorganismos con propiedades probióticas (fundamentalmente, *Streptococcus thermophilus*, lactobacilos y bifidobacterias) son el yogur y otras leches fermentadas (sección II.1.5.2), pero también pueden encontrarse en el mercado quesos, leches infantiles, helados o bebidas a base de suero que contienen estos microorganismos. Generalmente, en estos productos, las cepas con propiedades probióticas aparecen mezcladas con otras bacterias para asegurar el desarrollo de las características organolépticas óptimas, siendo además de suma importancia seleccionar adecuadamente las cepas y la tecnología de fermentación para lograr tanto la adaptación óptima del probiótico al alimento como su prolongada viabilidad (Recio y López-Fandiño, 2005). Este último aspecto resulta fundamental para garantizar que la concentración de microorganismos durante toda la vida útil del producto sea la necesaria para proporcionar efectos beneficiosos para la salud, habiéndose sugerido en este sentido la necesidad de consumir un mínimo de 10^8 – 10^9 bacterias viables al día, el cual puede alcanzarse con la ingestión de 100 ml (o g) de un producto que contenga entre 10^6 – 10^7 ufc/ml (g) (Jayamanne y Adams, 2006).

Por otra parte, con respecto a la segunda vía para introducir probióticos en el organismo humano, la mayoría de las especialidades farmacéuticas (complementos alimenticios en su mayor parte y, minoritariamente, algunos medicamentos) que son comercializados como preparaciones probióticas para las personas incluyen microorganismos del género *Bifidobacterium* y del grupo de las bacterias lácticas, principalmente del género *Lactobacillus*. En este contexto, la presencia natural de lactobacilos en el tracto digestivo de animales y humanos ha sido considerada históricamente como beneficiosa para el hospedador, y, más recientemente, su asociación con la cavidad oral y el tracto urogenital en humanos ha llevado a que el género *Lactobacillus* constituya uno de los más empleados como probióticos para indicaciones tales como el tratamiento de la diarrea, el restablecimiento de la microbiota vaginal, el mantenimiento de niveles adecuados de colesterol o la higiene oral (Gómez-Sala, 2013). No obstante, otras bacterias lácticas incluidas en los géneros *Streptococcus* (sección II.1.5.3) y *Enterococcus* también forman parte de preparaciones probióticas para las personas. Con respecto a este último género, conviene destacar las cepas *E. faecium* SF68 (NCIMB10415,

comercializada como Bioflorin® por Cerbios-Pharma SA [Barbengo, Suiza]) y *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 (comercializada como Symbioflor 1 por SymbioPharm [Herborn, Alemania]) producidas en forma de complementos alimenticios indicados para el tratamiento de diarreas asociadas a antibióticos y de enfermedades recurrentes del tracto respiratorio superior (*e.g.*, sinusitis, bronquitis y tonsilitis), respectivamente (Franz *et al.*, 2011).

II.1.3.2.4. Bacterias lácticas como probióticos en alimentación animal. Aditivos zootécnicos

Determinadas especies pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas se encuentran entre los microorganismos empleados como aditivos para alimentación animal. En la UE, el Reglamento (CE) n° 1831/2003 establece un procedimiento comunitario para la autorización de la comercialización y uso de los aditivos para alimentación animal, la cual requiere la demostración tanto de su seguridad para la especie diana y para los consumidores, como de su eficacia. En lo que se refiere a esta última, los principales efectos beneficiosos de los probióticos en animales pueden ser resultado de su acción: (1) nutricional, derivada del (i) suministro de nutrientes (*e.g.*, ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos esenciales) y/o (ii) favorecimiento de la digestión (*e.g.*, producción de lipasas y proteasas) y (2) sanitaria (supresora de microorganismos patógenos), debida a (i) la producción de sustancias antimicrobianas tales como péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal denominados bacteriocinas (sección II.2.1), ácidos orgánicos, enzimas (lisozima y proteasas), sideróforos, peróxido de hidrógeno, amonio y/o diacetilo; (ii) la competencia por los nutrientes y energía disponibles o por los sitios de adhesión al epitelio intestinal u otras superficies mucosas, y (iii) la estimulación de la respuesta inmune del hospedador (Guillot, 2003; Corr *et al.*, 2007; Muñoz-Atienza, 2015). Estos mecanismos de acción pueden traducirse en una mejora del crecimiento y la tasa de conversión de los piensos y/o en una morbilidad/mortalidad reducida en los animales, así como en beneficios para el consumidor derivados de la mejora de la calidad de los alimentos obtenidos de estos animales (*e.g.*, restricción de la transmisión de patógenos zoonóticos a través de los alimentos) y en efectos positivos para el medio ambiente (Anadón *et al.*, 2006).

El Reglamento (CE) n° 1831/2003 establece cinco categorías de aditivos (tecnológicos, organolépticos, nutricionales, zootécnicos y coccidiostáticos/histomonostatos), de las cuales solo dos (tecnológicos y zootécnicos) incluyen microorganismos. Concretamente, los probióticos se incluyen dentro del grupo funcional de “estabilizadores de la flora intestinal” de la categoría de aditivos zootécnicos, constituido por microorganismos y otras sustancias definidas químicamente que, suministrados a los animales, producen un efecto positivo sobre la microbiota intestinal de los mismos, o del grupo “otros aditivos zootécnicos”. Las cepas de las distintas especies de bacterias lácticas autorizadas como probióticos en alimentación animal se recogen en el Registro Comunitario de Aditivos para Alimentación Animal elaborado de acuerdo con este Reglamento, el cual está disponible en Internet (European Union, 2014) y se actualiza periódicamente. Así, en la última edición publicada de este documento (revisión 185, mayo de 2014), dentro del grupo de las bacterias lácticas, aparecen autorizadas cepas de las

especies *E. faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici* y *S. thermophilus* para su empleo como aditivos zootécnicos en pollos y gallinas, lechones y cerdas, terneros, salmónidos y otros peces y/o camarones. Finalmente, conviene destacar el auge en los últimos años del interés por la aplicación de probióticos en animales de compañía con el fin de estimular su sistema inmunológico. En este área destaca la cepa *E. faecium* SF68 (NCIMB10415) comercializada en España como FortiFlora® (Nestlé Purina, Castellbisbal, Barcelona) y ProEnteric Triplex® (Bioibérica, S.A., Barcelona) como suplemento dietético para perros y gatos indicado para el manejo sintomático de la diarrea de distintos orígenes.

II.1.3.3. BACTERIAS LÁCTICAS COMO VACUNAS ORALES

Las técnicas actuales de ingeniería genética permiten la obtención de bacterias lácticas recombinantes que expresen, intra o extracelularmente, o unidos a la superficie celular, epítomos o determinantes antigénicos (región específica de un antígeno reconocida por los anticuerpos) de microorganismos patógenos y que, por lo tanto, pueden utilizarse como vacunas orales. El hecho de que las bacterias lácticas sean candidatas para el desarrollo de este tipo de vacunas deriva de algunas de sus propiedades como: (i) su consideración, generalmente, como microorganismos seguros o de grado alimentario (estatus GRAS y/o QPS) (sección II.1.3.2.2); (ii) sus propiedades adyuvantes (potenciadoras de la respuesta inmune); (iii) su baja capacidad de provocar una respuesta inmune intrínseca; (iv) su capacidad de adherencia y colonización de las mucosas, y (v) su resistencia a valores de pH ácidos (Dieye *et al.*, 2003; Wells y Mercenier, 2003; Hummel *et al.*, 2007; Wells, 2011; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011; Tarahomjoo, 2012). Particularmente, los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* están siendo empleados con éxito en el diseño de vacunas orales (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2013). En este contexto, *Lactococcus lactis* se ha empleado en la elaboración de vacunas frente al virus del dengue, *Streptococcus pneumoniae* y *Hi. pylori* (Sim *et al.*, 2008; Villena *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014), mientras que diversas especies del género *Lactobacillus*, entre las que se incluyen *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*, se han utilizado para el desarrollo de vacunas frente a *Candida albicans* y diversos virus influenza (Shibasaki *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

II.1.3.4. BACTERIAS LÁCTICAS COMO PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS NUTRACÉUTICAS

De la misma manera que las bacterias lácticas pueden emplearse como biorreactores para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés en el sector alimentario (sección II.2.2.9), es posible modificar, mediante ingeniería genética, determinadas rutas metabólicas de las mismas para la producción a gran escala de sustancias nutraceuticas (componentes de los alimentos que poseen efectos beneficiosos para la salud del consumidor), tales como: (i) vitaminas del grupo B (e.g., riboflavina, folatos y cobalamina); (ii) edulcorantes bajos en

calorías (*e.g.*, L-alanina, manitol, sorbitol y tagatosa); (iii) oligosacáridos; (iv) exopolisacáridos (EPS); (v) antioxidantes (*e.g.*, glutatión y tiorredoxina), y (vi) enzimas (*e.g.*, β -galactosidasa) (Hugenholtz *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2006; Morello *et al.*, 2008; Maischberger *et al.*, 2010). Debido al interés creciente de los consumidores por este tipo de sustancias, así como al empleo cada vez más frecuente de las mismas en la producción de alimentos funcionales, es previsible que la aplicación de las bacterias lácticas para este fin experimente un desarrollo considerable en los próximos años.

II.1.4. ASPECTOS HIGIÉNICO-SANITARIOS NEGATIVOS ASOCIADOS A LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Como se ha mencionado previamente, las bacterias lácticas desempeñan un papel fundamental en la elaboración de alimentos fermentados, ya sea añadidas intencionadamente en forma de cultivos iniciadores, protectores o adjuntos o por su presencia natural en las materias primas a partir de las que se obtienen estos alimentos. Asimismo, la mayoría de los miembros de este grupo se consideran seguros para el consumo humano y animal (estatus GRAS y/o QPS) y son percibidos por los consumidores como algo “natural” y beneficioso para la salud, por lo que su presencia en los alimentos goza de gran aceptabilidad. No obstante, a pesar de estos aspectos positivos, las bacterias lácticas pueden también estar relacionadas con la alteración de los alimentos, la producción de metabolitos tóxicos, la transferencia de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos y/o el desarrollo de infecciones oportunistas (Bourdichon *et al.*, 2012).

II.1.4.1. BACTERIAS LÁCTICAS COMO ALTERANTES DE LOS ALIMENTOS

La actividad metabólica de las bacterias lácticas puede provocar la alteración de diversos alimentos si se convierten en la microbiota dominante durante su almacenamiento, como, por ejemplo, (i) carnes y pescados envasados en condiciones de anaerobiosis o atmósferas modificadas, en las que producen acidez, sabores y olores anómalos, exudados lechosos y limosidad, hinchazón de los envases por producción de gas y decoloración (Björkroth *et al.*, 2000; Samelis *et al.*, 2000; Joffraud *et al.*, 2001; Lyhs *et al.*, 2001; Vermeiren *et al.*, 2004; Lyhs y Björkroth, 2008); (ii) ciertos vinos en los que la fermentación maloláctica es indeseable, ya que resulta en agriado, sabores defectuosos, turbidez, lodos, decoloración y viscosidad; estas alteraciones también pueden producirse por el desarrollo de otras bacterias lácticas que no intervienen en la fermentación maloláctica (Fleet, 1999, 2001), y (iii) cervezas, en las que provocan acidez excesiva, sabores y aromas defectuosos, turbidez, filamentosidad, sedimentos, viscosidad y decoloración (Campbell, 1997; Hartnett *et al.*, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; March *et al.*, 2005).

II.1.4.2. BACTERIAS LÁCTICAS COMO PRODUCTORAS DE AMINAS BIÓGENAS

En alimentos fermentados tales como el queso, el vino y los embutidos crudos curados, las bacterias lácticas, que pueden encontrarse en el alimento bien como consecuencia de su utilización como cultivos iniciadores o bien como constituyentes de su microbiota saprofita, pueden dar lugar durante el proceso de maduración o envejecimiento a la formación de aminas biógenas (*e.g.*, histamina, tiramina, putrescina y cadaverina), que son sustancias vaso- y psicoactivas (Ten Brink *et al.*, 1990; Silla, 1996). Aunque la ingestión de cantidades moderadas de estos compuestos no resulta problemática gracias a su metabolización por las enzimas monoamino- o diamino oxidasa del tracto gastrointestinal, el consumo de alimentos con cantidades elevadas de aminas biógenas o, en el caso de consumidores con sistemas de detoxificación no funcionales, con cantidades moderadas de las mismas, puede originar cuadros toxicológicos (*e.g.*, náuseas, alteraciones respiratorias, sofocos, sudoración, palpitaciones, cefaleas, erupciones cutáneas e hiper- e hipotensión) cuyas consecuencias para la salud pueden ser graves (Giraffa, 2002; Suzzi y Gardini, 2003). En este contexto, las dos aminas biógenas más frecuentemente reconocidas como causantes de intoxicación alimentaria son la histamina y la tiramina, producidas a partir de los aminoácidos precursores histidina y tirosina por la acción de las enzimas histidina descarboxilasa y tirosina descarboxilasa, respectivamente. La capacidad para producir aminas biógenas se ha descrito en una gran variedad de microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos, incluyendo miembros de la familia Enterobacteriaceae (*e.g.*, especies de los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*) y del género *Staphylococcus* (*e.g.*, *Staphylococcus saprophyticus*), así como bacterias lácticas de los géneros *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Ladero *et al.*, 2010; Muñoz-Atienza *et al.*, 2011). Por lo tanto, con el fin de evitar esta problemática, así como otros posibles efectos perjudiciales tanto para la salud humana como para la sanidad animal y el medio ambiente, resulta imprescindible evaluar cuidadosamente la seguridad de los microorganismos empleados intencionadamente en la alimentación humana y animal.

II.1.4.3. BACTERIAS LÁCTICAS E INFECCIONES OPORTUNISTAS EN HUMANOS

Aunque las bacterias lácticas son una causa relativamente rara de infecciones humanas (con excepción de algunas especies del género *Streptococcus*, de cuya relevancia como patógenos se tratará en la sección II.1.5.4), estos microorganismos se han identificado como los agentes responsables de infecciones locales y sistémicas. En este contexto, la mayoría de las infecciones están ocasionadas por cepas de especies del género *Enterococcus*, un grupo de microorganismos que, a pesar de su efecto probiótico demostrado y su utilidad en la industria alimentaria (secciones II.1.3.2.3 y II.1.3.2.4) pueden asimismo actuar como patógenos oportunistas, especialmente cuando se diseminan fuera del intestino, habiéndose descrito diversos factores de virulencia relacionados con su patogenicidad (Franz *et al.*, 2011). A este respecto, aunque su

implicación en infecciones en la comunidad es rara, los enterococos constituyen una causa muy importante de infecciones en el ambiente hospitalario, fundamentalmente endocarditis, infecciones del tracto urinario y biliar, septicemia, infecciones de heridas y meningitis. Más concretamente, los enterococos constituyen el tercer agente nosocomial más frecuente y son responsables del 12% de todas las infecciones hospitalarias (Yuen y Ausubel, 2014). Entre los factores que contribuyen al éxito de los enterococos como patógenos oportunistas, se encuentran su facilidad para adquirir (y diseminar) resistencias a antibióticos y factores de virulencia, su resistencia a condiciones medioambientales adversas (*e.g.*, desinfectantes hospitalarios) y su capacidad para formar *biofilms* (Hollenbeck y Rice, 2012). Aunque en los años 90 el 95% de los aislados clínicos de enterococos de los hospitales de EE. UU. se identificaron como *E. faecalis*, en los últimos años ha aumentado la incidencia de *E. faecium* en este ámbito hasta el 35%. Este hecho podría correlacionarse con la observación de que el 90 y 70% de los aislados de hospitales de EE. UU. presenta resistencia a ampicilina y vancomicina, respectivamente, frente al 1-5% de los aislados de *E. faecalis*, lo que podría resultar en la selección de *E. faecium* debido al empleo frecuente en este ámbito de antibióticos activos frente a *E. faecalis*. Diversos estudios han puesto de manifiesto que los aislados de *E. faecium* pueden agruparse en dos clados bien diferenciados: (i) A, en el que se agrupan la mayoría de los aislados clínicos, resistentes a la ampicilina y caracterizados por la presencia de un sistema fosfotransferasa que contribuye a la colonización intestinal durante el tratamiento con antibióticos (Zhang *et al.*, 2013), la secuencia de inserción IS16 y/o la isla de patogenicidad ICEEfm1 que incluye el gen de la proteína Esp (Willems y Van Schaik, 2009; Galloway-Peña *et al.*, 2012), y (ii) B, constituido por comensales del tracto gastrointestinal humano y sensibles a la ampicilina. A pesar de que la información existente es útil para excluir las cepas de *E. faecium* relacionadas con el ambiente hospitalario de su empleo en nutrición animal debido al riesgo que pueden representar para los consumidores más vulnerables (EFSA, 2012b), teniendo en cuenta la evolución de la epidemiología de las infecciones por *E. faecium* en los humanos, la ausencia de las citadas características del clado A no se considera suficiente para adjudicar el estatus QPS a esta especie (EFSA, 2012c). Por otra parte, también se han descrito ocasionalmente infecciones causadas por otros géneros de bacterias lácticas, incluyendo las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius*, *L. lactis*, *Lactococcus garvieae*, *P. acidilactici*, *Leuconostoc* spp. y *Carnobacterium divergens* (Salminen *et al.*, 2006; Claesson *et al.*, 2007; Mofredj *et al.*, 2007; Švec *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Casalta y Montel, 2008; Ogier y Serror, 2008; Ogier *et al.*, 2008; Schirmermeister *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2010; Iwen *et al.*, 2012).

Finalmente, conviene destacar que, a pesar de que recientemente se ha puesto de manifiesto una preocupación con respecto al incremento del consumo de bacterias lácticas con los alimentos o complementos alimenticios debido a su posible actuación como agentes causantes de infecciones, debe mencionarse que, generalmente: (i) estos microorganismos actúan como patógenos oportunistas, afectando a individuos particularmente sensibles por su edad

(fundamentalmente, niños recién nacidos y ancianos) o cuyas defensas están debilitadas como resultado de disfunciones del sistema inmune, quimioterapia o daño tisular o a pacientes sometidos a tratamientos prolongados con antibióticos, siendo además su prevalencia generalmente menor que la de otros microorganismos patógenos oportunistas, y (ii) los microorganismos implicados en estos procesos no son generalmente de origen alimentario (Salminen *et al.*, 1998; Adams, 1999; Franz *et al.*, 2010). Por otra parte, también se ha propuesto que el incremento aparente de los casos de infecciones causadas por bacterias lácticas podría deberse a la combinación de un mejor diagnóstico clínico y al incremento en la supervivencia de los pacientes con inmunodeficiencias (Franz *et al.*, 2010).

II.1.4.4. BACTERIAS LÁCTICAS Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

En las bacterias existen dos tipos de resistencia a los antibióticos: (i) intrínseca o natural, inherente a una especie determinada y que se encuentra, por tanto, en todas las cepas pertenecientes a la misma, y (ii) adquirida, caracterizada por encontrarse presente únicamente en determinadas cepas de una especie típicamente susceptible a un determinado antibiótico. Este tipo de resistencia puede deberse a genes adicionales adquiridos a través de la ganancia de ADN exógeno o a la mutación de genes propios en una cepa determinada (Ammor *et al.*, 2007; Van Reenen y Dicks, 2011). Aunque se asume que los determinantes involucrados en la resistencia intrínseca tienen un potencial remoto de transmisión horizontal, los responsables de resistencia adquirida mediada por la ganancia de genes exógenos (producto del intercambio genético entre distintas especies o distintos géneros) presentan un gran potencial para la misma, especialmente los que se encuentran localizados en elementos genéticos móviles (Devirgiliis *et al.*, 2011; Van Reenen and Dicks, 2011).

El enfoque QPS desarrollado por la EFSA para la determinación de la seguridad de los microorganismos introducidos deliberadamente en la cadena alimentaria establece que estos no deberán contener determinantes genéticos de resistencia adquiridas frente a antibióticos de importancia clínica que puedan contribuir a incrementar el conjunto de genes de resistencia a antimicrobianos ya presentes en la microbiota del tracto digestivo y al aumento de la transferencia de dichos genes a bacterias patógenas de las personas o los animales. A este respecto, el Panel sobre Aditivos y Productos o Sustancias utilizadas en Alimentación Animal (FEEDAP) de la EFSA elaboró un documento orientado a la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos de los microorganismos que pretendan emplearse como aditivos en alimentación animal (EFSA, 2012a). De acuerdo con este documento, si de la determinación de la concentración mínima inhibidora (CMI) frente a una serie de antibióticos de relevancia clínica se deduce su susceptibilidad o bien la existencia de resistencia intrínseca frente a uno o varios de los mismos, la cepa podrá ser empleada como aditivo en alimentación animal. Por otra parte, en caso de identificarse resistencia adquirida, deberá procederse a la determinación de la base genética de la misma (excepto en el caso de las cepas de *E. faecium* que presenten una CMI >2 µg/ml para la ampicilina, que serán excluidas directamente de su utilización como

aditivos en alimentación animal), de tal manera que: (i) si se demuestra que la resistencia se debe a una mutación cromosómica, la cepa podrá generalmente ser empleada como aditivo en alimentación animal, y (ii) si se detecta la presencia de determinantes genéticos transmisibles de resistencia, la cepa no podrá emplearse como aditivo en alimentación animal. Conviene destacar que la ausencia de detección de genes de resistencia a antibióticos conocidos (e.g., los presentes en la base de datos ARDB [del inglés *Antibiotic Resistance Genes Database* <http://ardb.cbcb.umd.edu/>] en una cepa con resistencia adquirida no es suficiente por sí sola para asumir que dicha resistencia no se debe a un mecanismo transmisible, y, por tanto, esta cepa tampoco podrá ser usada como aditivo en alimentación animal.

En lo que se refiere a las bacterias lácticas, existen estudios que describen la existencia de resistencia en distintas especies de este grupo a diversos antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria. En este sentido, se ha demostrado la resistencia intrínseca de algunas bacterias lácticas a los aminoglucósidos, quinolonas y glicopéptidos (Hummel *et al.*, 2007; Klein, 2011). Por otra parte, se ha detectado la presencia en este grupo bacteriano de determinantes genéticos transmisibles de resistencia a antibióticos, entre los que se encuentran los que codifican proteínas implicadas en la resistencia a tetraciclina (*tet*[M], *tet*[O], *tet*[S], *tet*[W], *tet*[K] y *tet*[L]), eritromicina (*erm*[A], *erm*[B], *erm*[C], y *mef* [A/E]) y lincosamidas (*lnu*[A]) (Ammor *et al.*, 2008; Hummel *et al.*, 2007; Muñoz-Atienza *et al.*, 2013; Ishihara *et al.*, 2013).

De especial relevancia resulta el fenómeno de resistencia a antibióticos en *E. faecium*, ya que, por una parte, como se ha comentado en la sección anterior, el incremento de las infecciones nosocomiales producidas por esta especie coincide con la emergencia de cepas resistentes o multirresistentes a antibióticos (EFSA, 2013), y, por otra, porque la capacidad de los enterococos para adquirir y diseminar material genético es bien conocida, especialmente en los aislados de origen hospitalario (Gilmore *et al.*, 2013). Además de las resistencias intrínsecas propias de esta especie (e.g., bajos niveles de resistencia a estreptogramina B y aminoglucósidos y resistencia a β -lactámicos característica de las cepas del clado A asociada a la proteína 5 de unión a penicilina [PBP5, del inglés *Penicillin-Binding Protein*, una de las enzimas encargadas de la síntesis de la pared celular que forma parte del genoma básico de *E. faecium*]), se ha descrito la presencia de los determinantes genéticos móviles que confieren resistencia a aminoglucósidos (*aph*[3']-III, *aac*[6'] y *aph*[2'']), β -lactámicos (*bla*, *pbp5*), glicopéptidos (*vanA/B/D/E/G/L/M*), fenicoles (genes *cat*), tetraciclinas (*tet*[O/L/K/S/U]), oxazolidinona-lincosamidas-pleuromutilinas-estreptogramina A (*cfr*) y macrólidos-lincosamidas-estreptograminas (*erm*[A/B/C/F/T], *lnu*[B], *vat*[B/D/E], *msr*[A/C/D], *lsa*[A], *vga*[B] y *mef*[A]) en enterococos de distintos orígenes, incluyendo cepas procedentes de animales de abasto y diversos alimentos (Arias y Murray, 2012; Hollenbeck y Rice, 2012; EFSA, 2013).

En los enterococos, la resistencia adquirida a la vancomicina, consecuencia de la alteración de la ruta biosintética del peptidoglicano que actúa como diana del antibiótico, es una de las más

preocupantes debido tanto a su diseminación a nivel mundial como a su posible transferencia tanto a *Staphylococcus aureus*, especialmente a las cepas resistentes a meticilina o MRSA (del inglés *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), como a otros patógenos (Willems *et al.*, 2005). Por otra parte, la resistencia a la ampicilina, que confiere resistencia cruzada a la piperacilina y cefalosporinas, es característica de los aislados de enterococos del clado A, que pueden llegar a presentar valores de CMI > 128 mg/l para este antibiótico. En este sentido, se ha descrito que existen dos formas alélicas de la proteína PBP5, *pbp5-S* y *pbp5-R*, las cuales difieren un 5% en su secuencia nucleotídica. Estas diferencias parecen ser claves para proporcionar resistencia a la ampicilina, puesto que la mayoría de las cepas clínicas (que contienen la forma *pbp5-R*) y de las aisladas en la comunidad (que contienen la forma *pbp5-S*) presentan valores de CMI para este antibiótico mayores y menores que 4 mg/l, respectivamente (Galloway-Peña *et al.*, 2011). Por este motivo, entre las características que la EFSA considera que discriminan entre cepas seguras y cepas que podrían causar infección en las personas se encuentra su sensibilidad/resistencia a la ampicilina, habiéndose establecido que las cepas seguras deben tener un valor de CMI ≤ 2 mg/l para la ampicilina (EFSA, 2012b). Desde su descripción por primera vez a finales de los años 80, la importancia de los enterococos resistentes a vancomicina (VRE, del inglés *Vancomycin Resistant Enterococci*) como causantes de infecciones nosocomiales ha ido en aumento. El tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos es problemático debido a que las cepas que contienen los determinantes genéticos *vanA* y *vanB* son también típicamente resistentes a otros tipos de antibióticos (Linden, 2007; Hollenbeck y Rice, 2012). En este sentido, aunque existen aún muchas incógnitas acerca de la epidemiología de los VRE, los datos disponibles indican que la diseminación de cepas de *E. faecium* clínicas resistentes a ampicilina es uno de los prerequisites necesarios para el establecimiento de VRE y la diseminación de la resistencia a vancomicina en el ambiente hospitalario (Werner *et al.*, 2008). Así, en EE. UU., la emergencia de VRE tuvo lugar en un grupo de cepas resistentes a la ampicilina que habían adquirido un papel cada vez más relevante frente a *E. faecalis* como patógenos nosocomiales a lo largo de los años 90, siendo en la actualidad el 90% de las cepas clínicas de *E. faecium* resistentes a ampicilina y el 70% a vancomicina. De manera similar, en Europa, aunque inicialmente se aislaron cepas de VRE sensibles a la ampicilina de la comunidad (personas sanas, alimentos y animales de abasto en los que se había utilizado avoparcina como promotor de crecimiento hasta su prohibición en 1997), más recientemente, el incremento de cepas resistentes a la ampicilina en el ámbito hospitalario ha precedido también a su adquisición de resistencia a la vancomicina (Werner *et al.*, 2008; EFSA, 2012b). Aunque el tratamiento de elección para las infecciones ocasionadas por cepas de *E. faecium* sensibles a ampicilina y glicopéptidos continúa siendo la ampicilina, la existencia cada vez más frecuente de cepas resistentes a múltiples antibióticos limita considerablemente las opciones terapéuticas en este tipo de procesos. A este respecto, el tratamiento de las infecciones causadas por VRE se restringe básicamente a la utilización de antibióticos introducidos recientemente en la práctica clínica como quinupristina/dalfopristina,

linezolid, tigeciclina o daptomicina, con los inconvenientes de que estos fármacos están aprobados únicamente para ciertas indicaciones y de que también se han observado resistencias frente a los mismos (Linden, 2007; Werner *et al.*, 2008). Esta problemática pone de manifiesto la necesidad de establecer medidas más eficaces para la prevención del desarrollo y la diseminación de la resistencia a antibióticos en estos microorganismos mediante programas de control de la infección y de uso correcto de los antibióticos, así como de desarrollar nuevos antibióticos u otras estrategias alternativas (*e.g.*, probióticos y terapia anti-adhesión) para su tratamiento (Werner *et al.*, 2008; Hollenbeck y Rice, 2012; Krachler y Orth, 2013).

II.1.5. GÉNERO *Streptococcus*

Los estreptococos son bacterias Gram-positivas, de morfología esférica y con un tamaño menor de 2 μm , que aparecen agrupadas en cadenas o pares. Asimismo, son microorganismos anaerobios facultativos cuyo crecimiento se ve favorecido en presencia de 5% de CO_2 , homofermentativos, catalasa y oxidasa negativos y, en algunos casos, como el de *S. pneumoniae*, provistos de una cápsula que permite serotiparlos.

Debido a la elevada heterogeneidad de los microorganismos del género *Streptococcus*, a lo largo del tiempo se han propuesto diversos sistemas para su clasificación basados en: (i) el perfil de hemólisis generado en agar sangre; (ii) la composición antigénica; (iii) las características de crecimiento; (iv) los perfiles resultantes de diversas pruebas bioquímicas, y (v) la secuencia nucleotídica de determinados genes. Además, a lo largo de los años, la taxonomía y nomenclatura de los miembros de este género ha sufrido numerosos cambios (Facklam, 2002; Euzéby, 2010). En este contexto, el primer intento de clasificar los estreptococos fue realizado por Shottmuller (1903), quien diferenció entre cepas β -hemolíticas y no β -hemolíticas en agar sangre. Posteriormente, Lancefield (1933) demostró una asociación entre la producción de β -hemólisis y la presencia de un grupo específico de carbohidratos de la pared celular, mientras que Sherman (1937) propuso una nueva clasificación que dividía los estreptococos en cuatro grupos en función de su actividad hemolítica, el antígeno carbohidrato, la capacidad de fermentación y la tolerancia a altos niveles de pH o presencia de sal. Concretamente, estos cuatro grupos fueron: (i) grupo piógeno, que incluía las cepas β -hemolíticas de los grupos antigénicos A, B, C, E, F y G; (ii) grupo viridans (actualmente vigente), que incluía cepas no β -hemolíticas, no tolerantes a altos niveles de pH ni a la presencia de sales, e incapaces de crecer a 10 °C; (iii) grupo láctico (reclasificado posteriormente como género *Lactococcus*), que incluía cepas asociadas con la obtención de productos lácteos y caracterizadas por la ausencia de actividad β -hemolítica, su capacidad para crecer a 10 °C pero no a 45 °C y su incapacidad para crecer a concentraciones $\geq 6,5\%$ de cloruro sódico (NaCl), y, finalmente, (iv) grupo *Enterococcus* que, aunque incluía algunas especies β -hemolíticas, se diferenciaba del resto de estreptococos por su capacidad para crecer en medios con elevado pH y alto contenido en sales y en un amplio rango de temperaturas (10–45 °C) (Facklam, 2002). No obstante, los sistemas de

identificación basados en las características fenotípicas no permiten la identificación definitiva de los miembros de este grupo a nivel de especie debido a que analizan un número limitado de características bioquímicas, que, además, son muy variables dentro de la misma especie, a la escasa reproducibilidad de algunos de los ensayos existentes y al hecho de que no todas las especies están incluidas en las bases de datos (Glazunova *et al.*, 2010). A este respecto, se han empleado técnicas moleculares, como la hibridación ADN-ADN o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) para la amplificación y secuenciación de diversos genes diana (*ADNr16S*, *sodA*, *ddl*, *tuf*, etc.) con el objeto de clasificar a los miembros del género *Streptococcus*. Dado que la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S no permite obtener resultados de identificación concluyentes ya que las especies que se encuentran estrechamente relacionadas presentan secuencias prácticamente idénticas, Poyart *et al.* (1998) emplearon la secuenciación del gen *sodA*, que codifica una supeoróxido dismutasa dependiente de manganeso y cuya secuencia presenta una mayor variabilidad interespecies, para la identificación y clasificación de los estreptococos, lo que resultó en la propuesta de seis grupos (Tabla II.4): (i) piogénico, (ii) bovis, (iii) mutans, (iv) salivarius, (v) anginosus, también denominado “milleri”, y (vi) mitis. Conviene destacar que los estreptococos de los cuatro últimos grupos constituyen el denominado grupo “viridans”, los cuales, salvo *S. thermophilus*, se consideran comensales del tracto respiratorio superior de las personas y, excepto *S. pneumoniae*, únicamente patógenos cuando tienen acceso a la sangre. Aunque el empleo de esta técnica está considerada como una de las más fiables para la identificación de los estreptococos, recientemente, Glazunova *et al.* (2010) utilizaron la secuenciación parcial del gen *recN*, que codifica una proteína de recombinación y reparación, para la determinación de la relación filogenética y la identificación de los estreptococos. Los resultados obtenidos mediante el empleo de esta técnica, que, de acuerdo con los autores constituye la mejor herramienta disponible para el estudio de la evolución y la identificación de los estreptococos, permitieron clasificar a los estreptococos en seis grupos: (i) “pyogenes”; (ii) “equinus”; (iii) “salivarius”; (iv) “mutans”; (v) “hyovaginalis”, y (vi) “suis”. Por otra parte, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos como para apoyar la existencia del grupo “mitis”, sí permitieron la formación de tres subgrupos, formados por (i) *Streptococcus sanguinis*/*Streptococcus cristatus*/*Streptococcus sinensis*; (ii) *Streptococcus anginosus*/*Streptococcus intermedius*/*Streptococcus constellatus* (denominado subgrupo “anginosus”); y (iii) *Streptococcus mitis*/*Streptococcus infantis*/*Streptococcus peroris*/*Streptococcus oralis*/*Streptococcus oligofermentans*/*S. pneumoniae*/*Streptococcus pseudopneumoniae* (Tabla II.5). En cualquier caso, la descripción continua de nuevas especies a partir de aislados de origen humano, animal y medioambiental¹ y el hecho de que, en general, los estreptococos constituyen un grupo muy heterogéneo en el que la posición de sus miembros difiere en función

¹En el momento de redacción de esta memoria (agosto de 2015), la herramienta de búsqueda *Taxonomy browser* de la base de datos NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*) disponible en Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1301>) muestra la existencia de 97 especies y 9 subespecies.

del gen estudiado, la utilización de nuevas aproximaciones para su identificación (como, por ejemplo, la técnica de espectrometría de masas [MALDI-TOF MS], sección II.1.5.1) resultará muy probablemente en la revaluación del estado taxonómico de este género en el futuro.

Tabla II.4. División taxonómica del género *Streptococcus* adaptada de Poyart *et al.* (1998)

Nombre del grupo	Especies	Origen
Grupo piogénico		
	<i>S. agalactiae</i>	Humano y animal (bovinos)
	<i>S. canis</i>	Humano y animal (perros)
	<i>S. dysgalactiae</i>	Humano y animal (bovinos)
	<i>S. equi</i>	Animal (caballos)
	<i>S. iniae</i>	Humano y animal (delfines y peces)
	<i>S. porcinus</i>	Humano y animal (cerdos)
	<i>S. pyogenes</i>	Humano
Grupo bovis		
	<i>S. bovis</i>	Humano y animal
	<i>S. equinus</i>	Animal (equinos y bovinos)
	<i>S. alactolyticus</i>	Animal (cerdos y aves)
Grupo mutans		
	<i>S. cricetus</i>	Humano y animal (ratas)
	<i>S. downei</i>	Animal (monos)
	<i>S. mutans</i>	Humano
	<i>S. sobrinus</i>	Humano y animal (ratas)
Grupo salivarius		
	<i>S. salivarius</i>	Humano
	<i>S. thermophilus</i>	Productos lácteos
	<i>S. vestibularis</i>	Humano
Grupo anginosus		
	<i>S. anginosus</i>	Humano
	<i>S. constellatus</i>	Humano
	<i>S. intermedius</i>	Humano
Grupo mitis		
	<i>S. mitis</i>	Humano
	<i>S. oralis</i>	Humano
	<i>S. pneumoniae</i>	Humano
	<i>S. sanguinis</i>	Humano
	<i>S. parasanguinis</i>	Humano
	<i>S. gordonii</i>	Humano

Aunque muchas especies del género *Streptococcus* están relacionadas con importantes procesos infecciosos, otras se consideran microorganismos comensales de la piel y las mucosas de humanos y animales o microorganismos de utilidad para las industrias alimentaria y farmacéutica. De todos estos aspectos se tratará en las siguientes secciones, haciendo especial énfasis en las especies *Streptococcus infantarius*, perteneciente al complejo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*, y *S. pneumoniae* por su relevancia en el desarrollo del trabajo de investigación que se presenta en esta memoria.

Tabla II.5. División taxonómica del género *Streptococcus* adaptada de Glazunova et al. (2010)

Nombre del grupo	Especies
Grupo "pyogenes"	<i>S. pyogenes</i> <i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>dysgalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i> <i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i> <i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i> <i>S. castoreus</i>
Grupo "equinus"	<i>S. alactolyticus</i> <i>S. gallolyticus</i> subesp. <i>gallolyticus</i> <i>S. gallolyticus</i> subesp. <i>pasteurianus</i> <i>S. gallolyticus</i> subesp. <i>macedonicus</i> <i>S. infantarius</i> subesp. <i>infantarius</i> <i>S. infantarius</i> subesp. <i>coli</i> <i>S. equinus</i>
Grupo "salivarius"	<i>S. salivarius</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. vestibularis</i>
Grupo "mutans"	<i>S. mutans</i> <i>S. macacae</i> <i>S. devriesei</i> <i>S. rattii</i>
Grupo "hyovaginalis"	<i>S. hyovaginalis</i> <i>S. pluranimalium</i> <i>S. thoraltensis</i>
Grupo "suis"	<i>S. suis</i> <i>S. acidominimus</i> <i>S. gallinaceus</i> <i>S. minor</i> <i>S. ovis</i>
Grupo "mitis" ^a	
Subgrupo (i)	<i>S. sanguinis</i> <i>S. cristatus</i> <i>S. sinensis</i>
Subgrupo (ii)	<i>S. anginosus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. constellatus</i>
Subgrupo (iii)	<i>S. mitis</i> <i>S. infantis</i> <i>S. peroris</i> <i>S. oralis</i> <i>S. oligofermentans</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. pseudopneumoniae</i>

^aEl establecimiento de este grupo no está apoyado estadísticamente por los resultados obtenidos de la secuenciación del gen *rec N*.

II.1.5.1. COMPLEJO *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

El complejo denominado *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* (SBSEC, del inglés *S. bovis*/*S. equinus complex*) está constituido por bacterias de morfología cocoide Gram-positivas, anaerobias facultativas y que expresan el antígeno D de Lancefield en su superficie. Asimismo, incluye especies aisladas de animales, humanos y diversos alimentos (principalmente de origen lácteo), algunas de las cuales se han vinculado con patologías tales como endocarditis, sepsis y carcinoma de colon (Sillanpää *et al.*, 2008; Abdulmir *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2009). La taxonomía de este complejo ha sufrido numerosos cambios en los últimos años. A este respecto, inicialmente este grupo englobaba a las especies *S. equinus* y *S. bovis*, distinguiéndose dentro de esta última los biotipos I, II/1 y II/2 (Coykendall y Gustafson, 1985; Knight y Shlaes, 1985). Posteriormente, el empleo de técnicas basadas en la hibridación ADN-ADN, así como en la secuenciación de los genes *ADNr 16S* y *sodA* resultó en la propuesta de nuevas especies y en la revisión de la nomenclatura de este grupo (Osawa *et al.*, 1995; Nelms *et al.*, 1995; Poyart *et al.*, 2002; Schlegel *et al.*, 2000, 2003). A este respecto, Poyart *et al.* (2002) propusieron el empleo del gen *sodA* como diana para llevar a cabo la identificación de los microorganismos pertenecientes al SBSEC debido a su buen poder de discriminación. Mediante el empleo de esta técnica, se diferenciaron 5 *clusters* (A, B, C, D y E) que se corresponden con 5 especies distintas: *S. equinus*, *Streptococcus gallolyticus*, *S. infantarius*, *Streptococcus pasteurianus* y *Streptococcus lutetiensis* (nuevo nombre adjudicado a las cepas clasificadas previamente como *S. infantarius* subesp. *coli*). Sin embargo, Schlegel *et al.* (2003) reclasificaron a los estreptococos pertenecientes al grupo *bovis* en función de los resultados obtenidos mediante las técnicas de hibridación ADN-ADN y secuenciación del gen *ADNr 16S*. A este respecto, los resultados obtenidos de la primera técnica indicaron la existencia de cuatro grupos (*DNA-cluster*): (i) *DNA-cluster* I, formado por *S. equinus* y *S. bovis*; (ii) *DNA-cluster* II, formado por *S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subesp. *macedonicus* y *S. gallolyticus* subesp. *pasteurianus*; (iii) *DNA-cluster* III, formado por *S. infantarius* subesp. *infantarius* y *S. infantarius* subesp. *coli*, y (iv) *DNA-cluster* IV, constituido por *S. alactolyticus*. Por otra parte, los resultados obtenidos de la secuenciación del gen *ADNr16S* dieron lugar al establecimiento de tres divisiones que incluían estos cuatro *DNA-clusters*, concretamente: (i) división 1, que incluye a *S. equinus*, *S. bovis* y las dos subespecies de *S. infantarius*; (ii) división 2, formada por las tres subespecies de *S. gallolyticus* pertenecientes al *DNA-cluster* II (*S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subesp. *macedonicus* y *S. gallolyticus* subesp. *pasteurianus*) y (iii) división 3, constituida por *S. alactolyticus* y *Streptococcus intestinalis*, pertenecientes al *DNA-cluster* IV.

Como se desprende de lo expuesto anteriormente, la identificación de los miembros del SBSEC es una tarea muy compleja; no obstante, la secuenciación del gen *sodA* está considerada como uno de los métodos más fiables para la misma (Glazunova *et al.*, 2009). Además, recientemente se ha determinado la utilidad de la técnica de MALDI-TOF MS como método

alternativo para la identificación de los miembros pertenecientes a este grupo mediante su comparación con la de secuenciación del gen *sodA*, habiéndose observado una resolución taxonómica similar para ambas. No obstante, los resultados obtenidos mediante el empleo de estas dos técnicas difirieron en la asignación de la relación existente entre *S. gallolyticus* subesp. *macedonicus* y *S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus* (diferenciables como subespecies de *S. gallolyticus* mediante MALDI-TOF MS pero no mediante la secuenciación del gen *sodA*) y *S. gallolyticus* subesp. *pasteurianus* y *S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus* (incluidas en el mismo *cluster* mediante MALDI-TOF MS pero consideradas especies distintas mediante la secuenciación del gen *sodA*). Por otra parte, también se obtuvieron resultados distintos en lo que se refiere a la separación de *S. bovis* y *S. equinus*, pues mientras que la técnica de MALDI-TOF MS permitió su discriminación, la secuenciación del gen *sodA* sugirió que se trataba de una única especie, lo que también fue propuesto por Schlegel *et al.* (2003). En definitiva, aunque la técnica de MALDI-TOF MS se presenta como una alternativa fiable, rápida y económicamente rentable para la identificación de los miembros del SBSEC en el ámbito del diagnóstico clínico de rutina, son necesarios estudios adicionales para la detección de biomarcadores característicos que permitan la asignación precisa de los aislados a las distintas subespecies incluidas en este complejo (Hinse *et al.*, 2011).

II.1.5.1.1. Virulencia del SBSEC

A pesar de la asociación de algunas especies pertenecientes a este complejo con diversas enfermedades en humanos, apenas existe información acerca de los mecanismos de patogenicidad que presentan los miembros de este grupo. A este respecto, los factores de virulencia asociados a estas especies han sido principalmente identificados de acuerdo a las homologías que presentaban con factores de virulencia descritos en otros estreptococos. Sin embargo, los conocimientos acerca de los mecanismos de patogenicidad específicos del SBSEC están limitados a factores implicados en los procesos de adhesión y colonización (*e.g.*, *pili* y formación de *biofilms*) (Jans *et al.*, 2015). Conviene destacar que la mayoría de los estudios muestran a *S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus* como la especie de referencia (Boleij *et al.*, 2009, 2011; Sillanpää *et al.*, 2009; Rusniok *et al.*, 2010; Papadimitriou *et al.*, 2014). La adherencia específica del SBSEC parece estar relacionada con la presencia de proteínas LPxTG-types con características de MSCRAMM (del inglés, *Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), estando presentes principalmente en la especie *S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus* y, en menor medida, en *S. gallolyticus* subesp. *pasteurianus*, *S. gallolyticus* subesp. *macedonicus* y *S. lutetiensis*. Con base en su función y diana de acción, estas proteínas se denominan Acb (del inglés *Ahesion to Collagen of the S. bovis group*) y Sbs (del inglés *S. bovis group surface protein*: Sbs2, Sbs6, Sbs7 and Sbs10-16). A este respecto, en *S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus* se ha identificado la presencia de tres genes que codifican proteínas Acb similares a las proteínas principales de las subunidades que componen los *pili*, junto a otro gen que codifica una proteína LPxTG-type y una enzima sortasa C, lo que sugiere que esta especie

puede codificar tres tipos distintos de *pili* (*pili* 1, *pili* 2 y *pili* 3) (Sillanpää *et al.*, 2009). El *pili* 1 es esencial para la adhesión al colágeno tipo 1 facilitando la colonización. Asimismo, parece participar en la formación de *biofilms* en tejidos dañados de válvulas cardíacas y adenomas colorrectales donde el colágeno tipo 1 está expuesto (Danne *et al.*, 2011). Conviene destacar que así como en *S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus* se han identificado los genes responsables de codificar los tres *pili*, un estudio de Papadimitriou *et al.* (2014) reveló que la cepa aislada de sangre *S. pasteurianus* ATCC43144 y las cepas de origen lácteo *S. macedonicus* ACA-DC 198 y *S. infantarius* CJ18 sólo presentan los genes responsables de codificar el *pili* 3. Tras el proceso de adhesión, estos microorganismos son capaces de formar *biofilms*, lo que les proporciona protección frente a la respuesta inmunitaria del hospedador y otras actividades antimicrobianas. En *S. gallolyticus* subesp. *gallolyticus* se ha descrito la formación de biopelículas en superficies constituidas por colágenos tipos I y IV; sin embargo, la formación de *biofilms* por otras especies del complejo, incluyendo *S. macedonicus* y *S. infantarius*, parece no ser tan específica, siendo capaces de crecer formando *biofilms* en superficies de polietileno independientemente de la presencia o no de colágeno (Boleij *et al.*, 2011).

II.1.5.1.2. Resistencia a antibióticos en el SBSEC

La detección creciente de genes de resistencia a antimicrobianos en especies del SBSEC de origen clínico es indicativa de la existencia de un riesgo potencial para la salud debido a la emergencia de las infecciones ocasionadas por microorganismos de este complejo. La residencia de estas bacterias en el intestino de personas y animales, hábitat en el que conviven con multitud de microorganismos multirresistentes, favorece la adquisición de estos genes mediante transferencia horizontal (Jans *et al.*, 2015). En este contexto, se ha descrito la presencia de los determinantes genéticos que confieren resistencia a la eritromicina (principalmente *erm*[B] y, en algunos casos, *mef*[A]) (Leclercq *et al.*, 2005), macrólidos-lincosamidas-estreptogramina B (*erm*[B] o *erm*[T]) (Teng *et al.*, 2001), tetraciclinas (*tet* [M/L/O]), kanamicina y estreptomicina (*aphA-3'* o *aad-6*, respectivamente) (Leclercq *et al.*, 2005) y gentamicina (una variante del trasposón Tn4001, originalmente detectado en *S. aureus*) (Chow *et al.*, 2007). Además, se ha relacionado la resistencia a la vancomicina con la presencia del gen *vanB* en un aislado de heces humanas (Poyart *et al.*, 1997) y de los genes *vanA* y *vanB* en aislados de *S. gallolyticus* procedentes de heces de terneros (Mevius *et al.*, 1998). En dos de estos aislados también se detectó el gen *vanB2* localizado en una variante del transposón Tn5382, originalmente detectado en enterococos (Dahl y Sundsfjord, 2003). Por otra parte, existen muy pocos estudios sobre la presencia de genes de resistencia en SBSEC asociados a los alimentos. A este respecto, se ha detectado *tet*(M) en estreptococos aislados de quesos italianos elaborados a partir de leche cruda (Devirgiliis *et al.*, 2010).

II.1.5.1.3. *Streptococcus infantarius* subesp. *infantarius*

La especie *S. infantarius*, descrita por primera vez por Bouvet *et al.* (1997), está formada por bacterias de morfología cocoide Gram-positivas que forman cadenas cortas, no móviles, no esporuladas, catalasa-negativas, anaerobias facultativas, incapaces de crecer en presencia de NaCl al 6,5% (w/v) y cuyo crecimiento en agar sangre da lugar a colonias circulares no pigmentadas y α -hemolíticas. Aunque inicialmente se consideró la existencia de dos subespecies dentro de esta especie (*S. infantarius* subesp. *infantarius* [β -glucosidasa y esculina variable] y *S. infantarius* subesp. *coli* [β -glucosidasa y esculina positivas]) (Schlegel *et al.*, 2000), posteriormente se sugirió que *S. infantarius* subesp. *coli* debería constituir una especie independiente denominada *Streptococcus lutetiensis* (Poyart *et al.*, 2002).

S. infantarius subesp. *infantarius* se ha aislado de diversos orígenes, incluyendo heces de niños y sangre de pacientes con endocarditis (Schlegel *et al.*, 2000), bebidas obtenidas por fermentación de cereales (Mukisa *et al.*, 2012), guisantes congelados (Schlegel *et al.*, 2000) y productos lácteos fermentados (Abdelgadir *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2009; Wullschleger, 2009). Atendiendo a su aislamiento de personas enfermas, *S. infantarius* subesp. *infantarius* podría ser considerada una especie potencialmente patógena para los humanos. En este sentido, el gen *gtf*, que codifica la enzima glucosiltransferasa, es considerado un factor de virulencia potencial por ser responsable de la biosíntesis de una cápsula extracelular de polisacáridos que protege frente a la respuesta inmunitaria del hospedador (sección II.1.5.4.1.1) (Heraief *et al.*, 1982; Abdelgadir *et al.*, 2008). Sin embargo, *S. infantarius* subesp. *infantarius* también se ha aislado de diversos alimentos fermentados en cuya elaboración desempeña un papel fundamental. Así pues, en productos lácteos fermentados como el *gariss*, *roab* y *fènè* (Tabla II.2, sección II.1.3.1), *S. infantarius* subesp. *infantarius* constituye, junto a *Lactobacillus fermentum*, la microbiota predominante entre las bacterias lácticas (Abdelgadir *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2009; Wullschleger, 2009). Es interesante señalar que, a diferencia de lo que ocurre en la cepa tipo de esta especie, el análisis de cepas de *S. infantarius* subesp. *infantarius* aisladas de productos lácteos africanos como el *suusac* (Tabla II.2, sección II.1.3.1) reveló la presencia del operón *gal-lac* (implicado en el metabolismo de la lactosa) ausente en otras cepas del SBSEC, así como un crecimiento en lactosa similar al de *S. thermophilus* (Jans *et al.*, 2012b). A este respecto, se ha hipotetizado que la variante africana de *S. infantarius* subesp. *infantarius* podría haber adquirido esta ruta metabólica a través de la transferencia horizontal de genes de *S. thermophilus*, mejorando de esta forma su adaptación a un ecosistema diferente (Jans *et al.*, 2012a). En lo que se refiere a la seguridad del consumo de estos productos, a pesar de la alta prevalencia y dominancia de *S. infantarius* subesp. *infantarius* en los mismos y de la elevada frecuencia de su ingesta por la población de los lugares donde son elaborados, no existen datos que vinculen a esta especie con enfermedades. Sin embargo, también debe considerarse a este respecto que la baja esperanza de vida en estos países y la falta de recursos médicos para el diagnóstico impiden la realización de estudios que pudieran demostrar su

asociación con procesos patológicos (Jans *et al.*, 2012a). Por lo tanto, la aplicación potencial de *S. infantarius* subesp. *infantarius* en la elaboración de productos lácteos fermentados sugiere la conveniencia de realizar tanto estudios epidemiológicos como de la presencia de posibles factores de virulencia que permitan llevar a cabo una adecuada evaluación de la seguridad de la ingestión de esta especie por los consumidores (Jans *et al.*, 2012a, 2013).

Finalmente, además de su empleo en la elaboración de productos lácteos fermentados, *S. infantarius* subesp. *infantarius* también se empleó como aditivo en alimentación animal en la UE. A este respecto, la cepa *S. infantarius* CNCM I-841, combinada con *Lb. plantarum* CNCM I-840 y comercializada como Adjulact 2000®, estuvo autorizada como probiótico para terneros bajo la antigua Directiva 70/524/CEE sobre los aditivos en alimentación animal. Sin embargo, desde el fin de la autorización para su comercialización (17 de julio de 2004) no se ha vuelto a incluir ninguna cepa de *S. infantarius* en el Registro Comunitario de Aditivos para Alimentación Animal de la UE.

II.1.5.2. ESTREPTOCOCOS EN ALIMENTOS FERMENTADOS

Algunas especies pertenecientes al género *Streptococcus* desempeñan una función importante en la elaboración de alimentos fermentados (fundamentalmente productos lácteos) en los que contribuyen tanto a su conservación como al desarrollo de las características propias del producto. En este contexto, la disminución del pH debido al metabolismo fermentativo, junto con la actividad proteolítica y la producción de compuestos aromáticos, bacteriocinas (sección II.2.2.7.2) y/o EPS son características relevantes de estos microorganismos que influyen positivamente en la calidad organoléptica e higiénico-sanitaria y el valor nutricional de estos alimentos (Delorme, 2008; Maragkoudakis *et al.*, 2009).

S. thermophilus es un microorganismo termofílico ampliamente utilizado en la elaboración de productos lácteos, siendo considerado el segundo cultivo iniciador más empleado en la industria alimentaria después de *L. lactis* (Hols *et al.*, 2005; Delorme, 2008; Prajapati *et al.*, 2013). Junto a *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus vestibularis*, *S. thermophilus* forma parte del grupo *salivarius*. Las especies pertenecientes a este grupo, además de las pertenecientes a los grupos *mitis*, *mutans* y *anginosus* (Tabla II.4, sección II.1.5), son también conocidas como estreptococos *viridans* (Thompson *et al.*, 2013). Estas especies se consideran generalmente comensales de la cavidad oral y el tracto gastrointestinal y genital de los mamíferos, aunque también se han relacionado ocasionalmente con casos de endocarditis, bacteriemia y abscesos en pacientes con patologías previas (Angeletti *et al.*, 2015). No obstante, conviene destacar que la secuenciación genética de varias cepas de *S. thermophilus* ha puesto de manifiesto la ausencia o inactivación de genes relacionados con factores de virulencia presentes en estreptococos patógenos. Por otra parte, también ha revelado la adquisición de genes de *L. lactis* y *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, probablemente como consecuencia de su estrecha asociación con estas especies en los cocultivos usados en la elaboración de quesos y yogures

(Bolotin *et al.*, 2004). En este sentido, *S. thermophilus* constituye, hasta la fecha, la única especie del género *Streptococcus* que posee el estatus GRAS y QPS (Maragkoudakis *et al.*, 2009; Leuschner *et al.*, 2010; EFSA, 2014). El empleo de *S. thermophilus* es fundamental en la elaboración del yogur y de diversos tipos de queso, como los de tipo suizo, italianos (*e.g.*, *Parmigiano* y *Mozzarella*) y *Cheddar*. Aunque en la elaboración de quesos *S. thermophilus* puede emplearse tanto solo como en combinación con varios lactobacilos y cultivos iniciadores mesófilos, en la fabricación del yogur siempre se combina con *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* (Courtin *et al.*, 2002; Delorme, 2008). En este sentido, el Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el yogur o yoghurt, lo define como: “el producto de leche coagulada obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* a partir de leche o de leche concentrada, desnatadas o no, o de nata, o de mezcla de dos o más de dichos productos, con o sin la adición de otros ingredientes lácteos [...], que previamente hayan sufrido un tratamiento térmico u otro tipo de tratamiento, equivalente, al menos, a la pasteurización. El conjunto de los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en la parte láctea del producto terminado”. La utilización de ambos microorganismos está basada en que estos tienen una acción sinérgica en el proceso de elaboración. Así, el crecimiento inicial de *Lb. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* resulta en la producción de los metabolitos necesarios para el desarrollo subsiguiente de *S. thermophilus*, el cual, a su vez, libera ácido fórmico y dióxido de carbono, que estimulan el crecimiento del lactobacilo (Courtin *et al.*, 2002). El importante papel que desempeña *S. thermophilus* en la fermentación de la leche se basa en su capacidad de convertir rápidamente la lactosa en ácido láctico, provocando una drástica caída del pH y la producción de metabolitos fundamentales con propiedades tecnológicas. Adicionalmente, muchas cepas de *S. thermophilus* sintetizan EPS que contribuyen a la obtención de texturas viscosas deseadas en los productos fermentados, particularmente en el yogur (Delorme, 2008). Asimismo, esta especie no sólo desempeña un papel tecnológico, sino que también contribuye positivamente a la calidad higiénico-sanitaria de estos productos. En este sentido, se han caracterizado numerosas bacteriocinas producidas por cepas de *S. thermophilus* (Tabla II.14, sección II.2.2.6) que destacan por su actividad antimicrobiana frente a *P. acidilactici*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* (Marciset *et al.*, 1997; Aktypis *et al.*, 1998; Mathot *et al.*, 2003; Gilbreth y Somkuti, 2005; Kabuki *et al.*, 2007).

En lo que respecta al potencial probiótico de *S. thermophilus*, esta especie presenta, entre otras, las siguientes propiedades funcionales de interés: (i) resistencia a los jugos gástricos y sales biliares; (ii) capacidad de adhesión (moderada) al epitelio intestinal; (iii) actividad β -galactosidasa; (iv) capacidad de desconjugación de las sales biliares, y (v) producción de altos niveles de folato (Iyer *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Asimismo, entre los efectos beneficiosos derivados de su consumo, se han descrito los siguientes: (i) mejora de la diarrea en niños, de la enterocolitis en neonatos prematuros y la de enfermedad inflamatoria intestinal; (ii) mejora de la

digestión de la lactosa en individuos intolerantes a la misma, siendo este efecto uno de los mejor demostrados hasta la fecha; (iii) estimulación del sistema inmune asociado al intestino; (iv) reducción del riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer y úlceras por *HL. pylori*; (v) disminución de las infecciones intestinales y vaginales, y (vi) reducción del colesterol sanguíneo (Delorme, 2008; Iyer *et al.*, 2010; Adolfsson *et al.*, 2004; Prajapati *et al.*, 2013). En la mayoría de los casos, debido a su lento crecimiento en leche, las cepas de *S. thermophilus* con propiedades probióticas se añaden en forma de cultivos adjuntos junto con iniciadores mucho más activos en la producción de ácido; no obstante, teniendo en cuenta el interesante potencial probiótico de esta especie y los efectos beneficiosos que puede conferir a un amplio segmento de la población a través de su consumo en un producto tan popular como el yogur, resulta de gran interés la selección de cepas que desempeñen una función dual como iniciadores y probióticos para la obtención de alimentos con un valor añadido (Iyer *et al.*, 2010; Guarner *et al.*, 2005; Guarner *et al.*, 2012; McFarland, 2015).

Por otra parte, aunque *S. thermophilus* constituye uno de los principales cultivos iniciadores empleados en el sector lácteo, se ha descrito el aislamiento de otros estreptococos de productos lácteos, como *Streptococcus gallolyticus* subesp. *macedonicus* (anteriormente denominado como *Streptococcus macedonicus*) y *S. infantarius* subesp. *infantarius* (Abdelgadir *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2009; Wullschleger, 2009) (sección II.1.5.1.3). Más concretamente, *S. gallolyticus* subesp. *macedonicus* se ha aislado de numerosas variedades de quesos de producción artesanal y comercial en Grecia (Georgalaki *et al.*, 2009), Italia (Lombardi *et al.*, 2004; Pacini *et al.*, 2006; Aponte *et al.*, 2008) y Francia (Callon *et al.*, 2004), así como de productos lácteos tradicionales de distintas regiones de África (Jans *et al.*, 2013) y de una bebida obtenida mediante fermentación del maíz en México (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003). Asimismo, varios estudios han demostrado que *S. gallolyticus* subesp. *macedonicus* posee numerosas propiedades beneficiosas para su empleo en la industria alimentaria, incluyendo la actividad peptidasa implicada en la maduración del queso (Georgalaki *et al.*, 2000; Lombardi *et al.*, 2004) o la producción de EPS (Vincent *et al.*, 2001). Además, en el caso de la cepa *S. macedonicus* ACA-DC198 se ha descrito la producción de una bacteriocina del tipo de los lantibióticos (sección II.2.2.6) llamada macedocina, con actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos, incluyendo *Clostridium perfringens* (Maragkoudakis *et al.*, 2009), y alterantes de los alimentos como *Cl. tyrobutyricum* y *Brochothrix* sp. (Georgalaki *et al.*, 2002; Maragkoudakis *et al.*, 2009). Asimismo, esta cepa ha sido utilizada con éxito como adyuvante de cultivos iniciadores (Anastasiou *et al.*, 2007) y como cultivo protector en quesos frente a *Cl. tyrobutyricum* (Anastasiou *et al.*, 2009). Por último, conviene destacar que, aunque *S. thermophilus* sea actualmente la única especie del género *Streptococcus* considerada segura, Maragkoudakis *et al.* (2009) demostraron tras un exhaustivo estudio que *S. macedonicus* ACA-DC198 presentaba un patrón de seguridad similar al de esta especie. Esta observación sugiere que, aunque el género *Streptococcus* incluya varias especies altamente patógenas, otras parecen no constituir un riesgo potencial para la salud, por lo que podrían llegar a considerarse seguras

como sucede con especies del género *Bacillus*, algunas de las cuales han sido reconocidas como importantes patógenos, mientras que otras (e.g., *Bacillus lentus* y *Bacillus subtilis*) están incluidas en la lista QPS de cepas seguras (EFSA, 2008; Maragkoudakis *et al.* 2009; EFSA, 2014).

II.1.5.3. ESTREPTOCOCOS COMO PROBIÓTICOS

Algunas especies del género *Streptococcus* forman parte de la microbiota comensal de la cavidad oral, la garganta, el tracto gastrointestinal, la piel, y la región rectal (Cook *et al.*, 2013). En la actualidad los lactobacilos y las bifidobacterias son los principales microorganismos empleados como probióticos; sin embargo, recientemente está aumentando el interés por algunas especies del género *Streptococcus*, especialmente *S. salivarius* (Wescombe *et al.*, 2006; Di Pierro *et al.*, 2012) y *S. thermophilus* (Wang *et al.*, 2013). Como se ha descrito en la sección II.1.3.2.3, los medicamentos y complementos alimenticios constituyen una de las vías posibles para introducir probióticos en el organismo administrándose como preparados farmacéuticos en forma de cápsulas, pastillas, polvos o gránulos. A este respecto, en la Tabla II.6 se recogen las preparaciones probióticas que contienen cepas de *S. salivarius*, *S. oralis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus rattus* y *S. thermophilus* que pueden encontrarse actualmente en el mercado.

Tabla II.6. Preparaciones probióticas formuladas con cepas del género *Streptococcus* como principio activo

Nombre comercial/ Laboratorio	Principio activo/cepa (s)	Forma farmacéutica	Indicaciones terapéuticas/ Observaciones
EvoraPlus®/Orogenics	ProBiora®/ <i>S. oralis</i> KJ3sm, <i>S. uberis</i> KJ2sm y <i>S. rattus</i> JH145(misma proporción)	Tableta	Mantenimiento de la salud oral
EvoraKids®/Orogenics	ProBiora®/ <i>S. oralis</i> KJ3sm, <i>S. uberis</i> KJ2sm y <i>S. rattus</i> JH145 (mayor proporción de <i>S. rattus</i>)	Tableta	Mantenimiento de la salud dental
EvoraPet®/Orogenics	ProBiora®/ <i>S. oralis</i> KH3sm, <i>S. uberis</i> KJ2sm y <i>S. rattus</i> JH145 (baja proporción de <i>S. rattus</i>)	Polvo	Manchas en dientes y halitosis en animales de compañía (perros y gatos)
EvoraPro®/Orogenics	ProBiora®/ <i>S. oralis</i> , <i>S. uberis</i> y <i>S. rattus</i> (misma proporción)	Tableta	Reestablece el equilibrio de la microbiota oral humana tras una profilaxis profesional
BLIS K12®/BLIS Technologies	<i>S. salivarius</i> K12	Pastillas, tableta, chicles, polvo	Mantiene la salud del tracto respiratorio superior y garganta y refuerza el sistema inmunitario
BLIS M18®/BLIS Technologies	<i>S. salivarius</i> M18	Pastillas	Protección de dientes y encías
Lactoflor Probiotic®/ Kandy Pharma	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. y <i>Lb. acidophilus</i>	Cápsulas	Restaura y mantiene la microbiota intestinal y refuerza el sistema inmunitario
VSL#3	Diversas especies de bifidobacterias, <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i>	Cápsulas	Tratamiento de la colitis ulcerosa y síndrome de colon irritable

Los efectos beneficiosos de las cepas probióticas de *Streptococcus* spp. se correlacionan, al menos parcialmente, con su capacidad para ejercer actividad antimicrobiana frente a patógenos de relevancia en las vías respiratorias altas, entre los que destacan *Streptococcus pyogenes*

(principal agente etiológico de la faringitis) y *S. pneumoniae* (uno de los principales responsables de la otitis media), así como frente a microorganismos responsables de la aparición de caries, principalmente *Streptococcus mutans*, y de la enfermedad periodontal, entre los que se incluye *Campylobacter rectus*. A este respecto, *S. salivarius* coloniza de forma natural la cavidad oral desde edades tempranas y se mantiene a lo largo de toda la vida del individuo sin ocasionar cuadros infecciosos en hospedadores sanos. Concretamente, la cepa *S. salivarius* K12 fue seleccionada para la elaboración de un probiótico oral por: (i) ejercer una potente actividad antimicrobiana frente a *S. pyogenes*, debida, fundamentalmente, a la producción de dos lantibióticos, salivaricina A2 y salivaricina B; (ii) actuar contra la halitosis; (iii) estimular la respuesta inmune, y (iv) reducir el número de episodios de otitis media. Asimismo, *S. salivarius* M18 destaca por su capacidad para prevenir la aparición de caries e infecciones de la cavidad oral causadas por *S. mutans* y *Streptococcus sobrinus* (Wescombe *et al.*, 2012b). Por otra parte, *S. oralis* y *S. uberis* están presentes significativamente en individuos que poseen una salud periodontal óptima, mientras que se encuentran prácticamente ausentes en individuos con afecciones en dicha región. Además, ambas especies muestran capacidad inhibitoria frente a patógenos periodontales mediante la producción de peróxido de hidrógeno. Por otra parte, conviene destacar que a pesar de que *S. rattus* sea una especie estrechamente relacionada con *S. mutans*, la inclusión en la preparación probiótica ProBiora3 (Oragenics, Alachua, Florida) de *S. rattus* JH145, una cepa que contiene una mutación que la incapacita para producir caries, resulta en la disminución de los niveles de *S. mutans* (Zahradnik *et al.*, 2009). Asimismo, existen estudios que confirman el efecto inhibidor de *S. thermophilus* sobre bacterias cariogénicas y de la placa dental (Comelli *et al.*, 2002; Delorme, 2008). Además, *S. thermophilus* no sólo resulta prometedor para su empleo como probiótico para el mantenimiento de la salud oral, sino también en la protección y el tratamiento de problemas gastrointestinales, mejora del crecimiento de los niños y reducción de la severidad e incidencia de diarreas agudas (Bibilone *et al.*, 2005; Tooley *et al.*, 2006). Además, su uso combinado con bifidobacterias parece mejorar la eficacia de estas en la prevención de la diarrea rotaviral (Saavedra *et al.*, 1994; Delorme, 2008). Finalmente, la cepa *S. thermophilus* TH-4 está siendo evaluada como probiótico por su capacidad para reducir la severidad de procesos patológicos como la mucositis (Wang *et al.*, 2013).

Al igual que sucede con los probióticos añadidos a los alimentos, las cepas consumidas como medicamentos o complementos alimenticios deben haber sido reconocidas como seguras por los organismos competentes. A este respecto, como ya se ha mencionado, en el ámbito de la UE *S. thermophilus* es actualmente la única especie del género *Streptococcus* a la que se le ha asignado el estatus QPS. Por otra parte, algunas cepas de *S. salivarius*, especie considerada en ocasiones como patógeno oportunista por su relación esporádica con procesos infecciosos en pacientes con problemas médicos preexistentes (Guglielmetti *et al.*, 2010), se comercializan como probióticos en países de fuera de la UE, como Nueva Zelanda, donde tras su empleo durante años no se ha descrito ningún daño para la salud de los consumidores (Burton *et al.*,

2006). En este sentido, la ausencia de resistencias transmisibles a antibióticos es un prerequisite fundamental para el empleo de una cepa como probiótico (FAO/WHO, 2002). A pesar de que actualmente no existen puntos de corte establecidos para *S. salivarius*, teniendo en cuenta los establecidos por la EFSA para *S. thermophilus* (EFSA, 2012a), las cepas de *S. salivarius* evaluadas resultan sensibles a una gran variedad de antibióticos de importancia clínica, presentando únicamente la resistencia intrínseca frente a bajos niveles de aminoglucósidos característica de las bacterias lácticas (Guglielmetti *et al.*, 2010). Asimismo, las cepas que constituyen el preparado comercial ProBiora3 (*S. oralis* KJ3sm, *S. uberis* KJ2sm, y *S. rattus* JH145), a pesar de no estar incluidas en la lista de microorganismos QPS, presentan sensibilidad a los antibióticos empleados más comúnmente para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos Gram-positivos, mostrando únicamente resistencia a la estreptomina, un antibiótico apenas empleado actualmente como agente terapéutico (Zahradnik *et al.*, 2009).

II.1.5.4. PROBLEMÁTICA SANITARIA ASOCIADA A LOS MICROORGANISMOS DEL GÉNERO *Streptococcus*

II.1.5.4.1. Patogenicidad de los estreptococos

Aunque muchas especies pertenecientes al género *Streptococcus* forman parte de la microbiota comensal de animales y humanos, algunas de ellas son importantes patógenos y presentan, por tanto, una elevada relevancia en el ámbito clínico. En este contexto, dentro de los estreptococos patógenos humanos destacan *S. pyogenes* (grupo A de Lancefield), *Streptococcus agalactiae* (grupo B de Lancefield) y *S. pneumoniae* (también conocido como neumococo). Así, por ejemplo, *S. pneumoniae* coloniza frecuentemente la nasofaringe de humanos formando parte de su microbiota comensal. Sin embargo, la respuesta inmunitaria del hospedador es esencial para evitar su sobrecrecimiento, lo que favorecería su difusión y la aparición de infecciones relevantes como otitis aguda, sinusitis, neumonía, bacteriemia y meningitis (sección II.1.5.5.4).

Del mismo modo, *S. pyogenes* puede dar lugar a lesiones inflamatorias purulentas en las vías respiratorias altas (faringitis y tonsilitis) o en la piel, fiebre reumática aguda, glomerulonefritis y síndrome de *shock* tóxico, entre otras afecciones (Patterson, 1996; Reglinski y Sriskandan, 2014). Asimismo, *S. agalactiae* se ha asociado principalmente con infecciones en mujeres embarazadas y neonatos, en los que puede ocasionar sepsis, meningitis y neumonías (Patterson, 1996; Cagno *et al.*, 2012).

Por otra parte, *Streptococcus dysgalactiae* subesp. *equisimilis* (grupos C y G de Lancefield) coloniza la faringe, la piel, el tracto gastrointestinal y la vagina, pudiendo estar relacionada con infecciones invasivas entre las que se incluyen el síndrome de *shock* tóxico (Proft *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2013). Finalmente, algunas especies pertenecientes al grupo D de Lancefield se han relacionado con bacteriemia y endocarditis (sección II.1.5.1) y, a pesar de su baja virulencia, algunos miembros del grupo viridans (*S. mutans*) se han vinculado con la aparición de caries,

enfermedad periodontal, meningitis, endocarditis y bacteriemias (Patterson, 1996; Han *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Dobson *et al.*, 2011). Finalmente, conviene destacar que las especies estreptocócicas más comúnmente aisladas en casos de bacteriemia son *S. oralis*, *S. mitis* y *S. salivarius* (Han *et al.*, 2006).

II.1.5.4.1.1. Virulencia de los microorganismos del género *Streptococcus*

Existen numerosos factores de virulencia asociados a especies del género *Streptococcus*, especialmente *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. En la Tabla II.7 se muestran los principales factores de virulencia descritos en las especies estreptocócicas de los grupos A, B, C y G de Lancefield relacionadas comúnmente con procesos patológicos en humanos, entre los que se incluyen *S. pyogenes* (grupo A), *S. agalactiae* (grupo B) y *S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis* (grupos C y G), así como sus funciones en la patogénesis de la infección estreptocócica. Por otra parte, los factores de virulencia de *S. pneumoniae* se describen en la sección II.1.5.5.3.

II.1.5.4.1.2. Resistencia a antibióticos en los microorganismos del género *Streptococcus*

En general, existen protocolos bien definidos para la determinación de la sensibilidad/resistencia a antibióticos en *Streptococcus* spp. patógenos, como los establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013), ya que estos microorganismos tienen gran relevancia como agentes etiológicos de enfermedades humanas. En este contexto, se conoce que las dos especies estreptocócicas más comúnmente aisladas de infecciones del tracto respiratorio, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, presentan problemas de susceptibilidad a diversos antibióticos empleados comúnmente en medicina humana; más concretamente a los β -lactámicos y macrólidos, entre otros, en el caso del primero (sección II.1.5.5.5) y a los macrólidos en el caso del segundo (Prieto *et al.*, 2002). Dado que hasta la fecha no se ha detectado en *S. pyogenes*, a diferencia de otros patógenos Gram-positivos como *S. pneumoniae* o *St. aureus*, resistencia a los β -lactámicos, estos antibióticos constituyen una opción para el tratamiento de infecciones causadas por esta especie. Sin embargo, la resistencia de *S. pyogenes* a la eritromicina parece ser similar a la encontrada en *S. pneumoniae* (Halpern *et al.*, 2005). Por otra parte, la resistencia a los macrólidos de *S. pyogenes*, que se ha ido extendiendo desde mitad de la década de los 70, es debida principalmente a los productos de los genes de resistencia *erm*(A), *erm*(B) y *mef*(A) (Creti *et al.*, 2005; Willems *et al.*, 2011). Asimismo, se ha observado la emergencia de la aparición de cepas de *S. pyogenes* resistentes a las fluoroquinolonas debido a mutaciones en los genes *parC* y/o *gyrA* (Pinho *et al.*, 2010), así como a las tetraciclinas, relacionada con la presencia de los genes *tet*(M) o *tet*(O) (Willems *et al.*, 2011). Finalmente, también se han descrito en esta especie altos niveles de resistencia a aminoglucósidos (Van Asselt *et al.*, 1992; Lopardo *et al.*, 2005).

Tabla II.7. Principales factores de virulencia descritos en *Streptococcus* spp.

Factor de virulencia	Función	Especies	Referencia
Proteínas M y <i>M-like</i>	Adherencia Resistencia a la fagocitosis Resistencia a la opsonización	Especies incluidas en los grupos A, C y G de Lancefield	Lancefield (1940); Maxted (1949); Alberti <i>et al.</i> (2005)
Peptidasa C5a	Inhibición de la función del componente C5 del complemento Unión a la fibronectina Invasión celular	Especies incluidas en los grupos A, B, C y G de Lancefield	Wexler <i>et al.</i> (1983); Cunningham (2000); Nobbs <i>et al.</i> (2009)
Ácido hialurónico sintasa	Síntesis del ácido hialurónico de la cápsula	Especies incluidas en los grupos A y C de Lancefield	DeAngelis <i>et al.</i> (1993); Cunningham (2000)
Hialuronidasa	Degradación del ácido hialurónico e invasión tisular	Especies incluidas en los grupos A, B, C y G de Lancefield y <i>S. pneumoniae</i>	Meyer y Rapport (1952); Ginsberg (1972)
Estreptoquinasa	Hidrólisis de la fibrina e invasión tisular	<i>S. pyogenes</i> y <i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i>	Christensen (1945); Malke <i>et al.</i> (1985); Huang <i>et al.</i> (1989); Nobbs <i>et al.</i> (2009)
Regulador de factores de virulencia (Mga)	Regula la transcripción de genes codificantes de factores de virulencia	<i>S. pyogenes</i>	McIver <i>et al.</i> (1995); McIver y Scott (1997); Cunningham (2000)
Glucosiltransferasa	Facilita adhesión e invasión tisular	<i>S. sanguinis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. infantarius</i> , <i>S. galloyticus</i> (entre otras)	Vacca-Smith <i>et al.</i> (1994); Hoshino <i>et al.</i> (2005)
Estreptolisina O (SLO)	Hemólisis. Efecto citotóxico	<i>S. pyogenes</i>	Alouf (1980)
Estreptolisinas S (SLS) y <i>S-like</i>	Hemólisis. Efecto citotóxico	<i>S. pyogenes</i> y <i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i> / <i>S. anginosus</i>	Alouf (1980); Steiner y Malke (2002); Wessels (2005); Tabata <i>et al.</i> (2013)
Exotoxinas pirogénicas-Superantígenos			
Exotoxina pirogénica SpeA	Proliferación masiva e inespecífica de células T	<i>S. pyogenes</i>	Weeks <i>et al.</i> (1986)
Exotoxina pirogénica SpeB	Actividad proteasa Activa la respuesta proinflamatoria	<i>S. pyogenes</i>	Hauser y Schlievert (1990)
Exotoxina pirogénica SpeC	Proliferación masiva e inespecífica de células T	Especies de los grupos A y G de Lancefield	Goshorn <i>et al.</i> (1988); Kittang <i>et al.</i> (2011)
Exotoxina pirogénica SpeF	Proliferación masiva e inespecífica de células T	<i>S. pyogenes</i>	Norrby-Teglund <i>et al.</i> (1994)
Exotoxina pirogénica SpeG	Proliferación masiva e inespecífica de células T	Especies de los grupos A, C y G de Lancefield	Proft <i>et al.</i> (1999); Sachse <i>et al.</i> (2002); Kittang <i>et al.</i> (2011)
Exotoxina pirogénica SpeH	Proliferación masiva e inespecífica de células T	Especies de los grupos A y G de Lancefield	Proft <i>et al.</i> (1999); Kittang <i>et al.</i> (2011)
Exotoxina pirogénica SpeJ	Proliferación masiva e inespecífica de células T	<i>S. pyogenes</i>	Proft <i>et al.</i> (1999)
Exotoxina pirogénica SpeL	Proliferación masiva e inespecífica de células T	Especies de los grupos A y C de Lancefield	Proft <i>et al.</i> (2003)
Exotoxina pirogénica SpeM	Proliferación masiva e inespecífica de células T	Especies de los grupos A y C de Lancefield	Proft <i>et al.</i> (2003)
Exotoxinas mutagénicas Smez/Smez-2	Proliferación masiva e inespecífica de células T	<i>S. pyogenes</i> y especies incluidas en los grupos C y G de Lancefield	Kamezawa <i>et al.</i> (1997); Proft <i>et al.</i> (1999)
Superantígeno estreptocócico (SSA)	Proliferación masiva e inespecífica de células T	Especies del grupo A de Lancefield	Reda <i>et al.</i> (1994)

Por otra parte, se ha descrito la resistencia a trimetoprim, tetraciclinas, kanamicina, cloramfenicol, eritromicina, clindamicina, estreptomycin y cefalosporinas en estreptococos del grupo B de Lancefield (Castor *et al.*, 2008; Boswihi *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2013). Se conoce que la resistencia a las quinolonas en *S. dysgalactiae* subesp. *equisimilis* está mediada por alteraciones en los genes *parC* y *gyrA* (Pinho *et al.*, 2010), así como que la resistencia a las tetraciclinas y macrólidos está relacionada con la presencia de *tet(S)* (Liu *et al.*, 2008) y *erm(A)* y *erm(T)* (Palmieri *et al.*, 2007; Gherardi *et al.*, 2014), respectivamente. Finalmente, también se han descrito altos niveles de resistencia a aminoglucósidos en los microorganismos de esta especie pertenecientes al grupo C de Lancefield debido a la adquisición de los genes *aac(6')-aph(2'')* (Lopardo *et al.*, 2005).

Por otra parte, aunque la información disponible acerca de la susceptibilidad de *S. thermophilus* a los antibióticos de relevancia clínica es escasa, se ha descrito en esta especie la presencia de genes de resistencia adquirida que confieren resistencia a la eritromicina (*erm*[B]), tetraciclina (*tet*[S], *tet*[M] y *tet*[L]) y a los aminoglucósidos (*ant*[6] y *aph*[3']-IIIa) (Rizzotti *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012). La posible existencia de estas resistencias en las cepas que pretendan añadirse deliberadamente a los alimentos y/o los piensos está contemplada en el requerimiento genérico establecido por la EFSA para los microorganismos que gozan del estatus QPS consistente en la necesidad de demostrar la ausencia de genes de resistencia transmisible a antibióticos de relevancia clínica (EFSA, 2014).

Finalmente, los antibióticos β -lactámicos son el tratamiento de elección frente a determinadas especies estreptocócicas, entre las que se incluyen *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* y *S. vestibularis*, que normalmente habitan en la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y el tracto genital femenino, pero que en ocasiones alcanzan el torrente sanguíneo provocando diversas infecciones de relevancia clínica (*e.g.*, endocarditis). Sin embargo, el número de cepas resistentes a los β -lactámicos está aumentando a nivel mundial. A este respecto, se ha descrito que la resistencia a la penicilina está mediada por la presencia de genes que codifican proteínas de unión a la penicilina modificadas, lo que disminuye su afinidad por los β -lactámicos. Asimismo, también se han descrito casos de multirresistencia, en los que cepas resistentes a los β -lactámicos presentan también resistencia a la eritromicina y la clindamicina (Uh *et al.*, 2004; Ergin *et al.*, 2011).

II.1.5.5. *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae es uno de los patógenos más importantes del ser humano, representando el principal agente etiológico de infecciones como la otitis media aguda, la sinusitis, la neumonía y la meningitis, enfermedades que provocan elevadas tasas de morbilidad y mortalidad tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados.

II.1.5.5.1. Características generales y taxonomía

S. pneumoniae es un microorganismo Gram-positivo de forma esférica que aparece formando cadenas o parejas, oxidasa y catalasa negativo, inmóvil, no esporulado, anaerobio facultativo, sensible a la optoquina y a la presencia de sales biliares, lo que acelera el proceso autolítico natural del neumococo. Este microorganismo se caracteriza por sus complejos requerimientos nutricionales, entre los que destaca la necesidad de colina para poder llevar a cabo la síntesis de los ácidos teicoico y lipoteicoico de su pared celular. Adicionalmente, los neumococos ejercen α -hemólisis durante su crecimiento en agar sangre debido a la producción de neumolisina, responsable de la hidrólisis de la hemoglobina, dando lugar a un pigmento verdoso (Fig. 2.1).

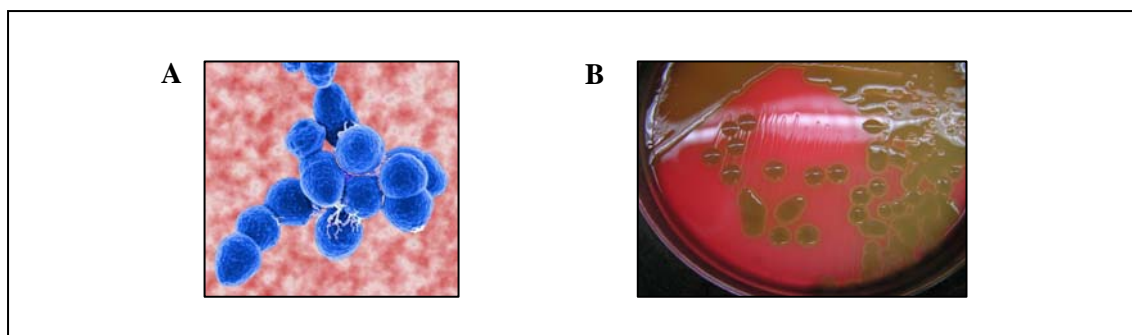


Figura 2.1. *Streptococcus pneumoniae*. A: células de *S. pneumoniae* al microscopio electrónico de barrido. B: colonias de *S. pneumoniae* productoras de α -hemólisis en agar sangre de caballo al 5% (w/v).

En lo que respecta a la taxonomía de *S. pneumoniae*, esta especie se incluye dentro del grupo mitis (Poyart *et al.*, 1998), constituido por especies que forman parte de la microbiota comensal de las vías respiratorias altas y al que también pertenecen *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. infantis*, *S. sanguinis* (anteriormente *Streptococcus sanguis*), *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis* (anteriormente *Streptococcus parasanguis*), *S. cristatus* (anteriormente *Streptococcus crista*), *S. peroris*, *Streptococcus australis* y *S. sinensis* (Hoshino *et al.*, 2005).

Por otra parte, las técnicas habitualmente empleadas para llevar a cabo la identificación de los aislados de *S. pneumoniae* se basan en la determinación de su susceptibilidad a la optoquina y/o a la presencia de bilis, o en el empleo de métodos inmunoquímicos o moleculares (Facklam, 2002). En lo que respecta a las técnicas inmunoquímicas, están basadas en las características antigénicas que presenta la cápsula de polisacáridos, principal factor de virulencia de *S. pneumoniae*. Esta cápsula favorece la adherencia del neumococo a las células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio superior e inhibe la fagocitosis mediada por los neutrófilos durante la infección. Por otra parte, la cápsula es responsable de desencadenar la respuesta humoral del sistema inmunológico caracterizada por la producción de anticuerpos específicos (Musher *et al.*, 2000). Existen dos sistemas de identificación basados en las propiedades antigénicas de la cápsula, el danés y el americano (Tabla II.8) (Kauffmann *et al.*, 1960; Lund, 1970; Henrichsen, 1979). El primero de ellos se basa en la reactividad cruzada de los antígenos capsulares entre distintos serotipos. Según este sistema los serotipos que presentan reactividad cruzada entre sí (similitud antigénica) son asignados a un mismo serogrupo al que se le asigna un número. En aquellos serogrupos con un único serotipo (*e.g.*, 8) la nomenclatura danesa de serogrupo y serotipo coincide. Sin embargo, en aquellos serogrupos con varios serotipos (*e.g.*, 19) cada serotipo se denomina con el número de serogrupo acompañado de una letra mayúscula: F, primer aislado del serogrupo; A, segundo aislado; B, tercer aislado, y así sucesivamente. Únicamente los serogrupos 6 (6A y 6B) y 9 (9A, 9L, 9N y 9V) no siguen este patrón. Por otra parte, en el sistema americano los serotipos se denominan con un número

siguiendo el orden de su descubrimiento sin tener en cuenta las reacciones cruzadas entre ellos (Musher *et al.*, 2000).

Tabla II.8. Sistemas de nomenclatura establecidos para la denominación de los serotipos de *S. pneumoniae*

NA ^a	ND ^b	NA	ND	NA	ND	NA	ND	NA	ND
1	1	21	21	41	34	61	35C	81	44
2	2	22	22F	42	33B	62	35A	82	48
3	3	23	23F	43	11A	63	22A	83	12A
4	4	24	24F	44	18A	64	23B	84	47A
5	5	25	25F	45	40	65	24A	-	10B
6	6A	26	6B	46	23A	66	35B	-	10C
7	7A	27	27	47	35A	67	32A	-	11D
8	8	28	28F	48	7B	68	9V	-	12B
9	9N	29	29	49	9L	69	39	-	16A
10	10F	30	15A	50	7C	70	33F	-	25A
11	11F	31	31	51	7F	71	38	-	33D
12	12F	32	32F	52	47F	72	45	6C	6C
13	13	33	9A	53	11C	73	46		
14	14	34	10A	54	15B	74	41A		
15	15F	35	35F	55	18B	75	43		
16	16F	36	36	56	18C	76	11B		
17	17F	37	37	57	19A	77	15C		
18	18F	38	41F	58	19B	78	17A		
19	19F	39	33C	59	19C	79	28A		
20	20	40	33A	60	24B	80	42		

^aNA, sistema de nomenclatura americano; ^bND, sistema de nomenclatura danés. Physicians' Desk Reference (49th Edition, 1995, page 1610), Laboratory Diagnosis of Pneumococcus Infections (Lund, 1960; H. Russell, *et al.*, 1978; Henrichsen, 1995; Park, 2007).

En lo que se refiere a las técnicas moleculares, destaca el empleo de la técnica de PCR para la amplificación de dianas específicas entre las que se incluyen, entre otras, el gen *ADNr16S* (Kawamura *et al.*, 1995). No obstante, esta técnica no resulta adecuada para su identificación debido al alto grado de conservación de la secuencia de este gen en este género. En este contexto, se ha propuesto la amplificación y secuenciación de otros genes constitutivos como los que codifican la: (i) D-alanina D-alanina ligasa (*ddl*) (Garnier *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 1999; Hoshino *et al.*, 2005), (ii) glutamato deshidrogenasa (*gdh*) (Okwumabua *et al.*, 2003; Hoshino *et al.*, 2005), (iii) subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Drancourt *et al.* 2004; Hoshino *et al.*, 2005) y (iv) superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*sodA*) (Poyart *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 2005). Sin embargo, el empleo de estos genes para la clasificación de los aislados de neumococo tampoco está completamente exento de limitaciones. En este contexto, se han realizado diferentes estudios con el objeto de diferenciar a *S. pneumoniae* de otras especies estreptocócicas de la cavidad oral. En este sentido, Suzuki *et al.* (2006) propusieron la amplificación mediante PCR de cuatro secuencias génicas altamente específicas

de *S. pneumoniae*: (i) el gen de la autolisina (*lytA*), (ii) el gen de la neumolisina (*ply*), (iii) el amplicón spn9802 y (iv) el amplicón spn9828. Ambos amplicones incluyen genes que codifican proteínas de función biológica desconocida no descritas previamente y que resultaron ser regiones altamente específicas de *S. pneumoniae* (Suzuki *et al.*, 2005).

En cualquier caso, debido a que es imposible descartar la posibilidad de que se produzca la transferencia de material genético (transformación natural) que facilite la adquisición de genes o fragmentos de genes específicos entre *S. pneumoniae* y otras especies del grupo viridans en el tracto respiratorio, la correcta identificación de esta especie continuará siendo complicada (Lal *et al.*, 2011).

II.1.5.5.2. Epidemiología de las infecciones neumocócicas

En la mayoría de los casos, la infección por *S. pneumoniae* requiere una colonización previa de la nasofaringe, en la cual influyen la edad del individuo, la fuente de exposición (*e.g.*, guarderías, hospitales, trabajo y hogar), la estación del año y la presencia de enfermedades víricas respiratorias concomitantes. Los niños son el principal reservorio de este microorganismo y, por lo tanto, la principal fuente de contagio para los adultos. En este sentido, a nivel mundial, el porcentaje de portadores de neumococos varía con la edad del individuo, siendo del 40-60% en niños \leq de 2 años, 12% en niños $>$ de 2 años, 6-10% en adolescentes y 3-4% en adultos (Dagan *et al.*, 1996; Cardozo *et al.*, 2008; Mehr y Wood, 2012).

Los factores de riesgo que predisponen a la aparición de las infecciones neumocócicas dependen de la localización de la infección en el organismo (Kristinsson, 2000). En este contexto, la otitis media es muy común en niños menores de 2 años y es la responsable de la mayoría de las consultas médicas y tratamientos antimicrobianos empleados en estos pacientes. Los factores de riesgo asociados a esta infección son: (i) corta edad y sexo masculino, (ii) existencia de casos de otitis media en hermanos, (iii) edad temprana de la primera otitis media, (iv) nula o corta duración de la alimentación mediante lactancia materna, (v) infecciones por virus respiratorios, (vi) asistencia a guarderías y (vii) contacto indirecto con el humo del tabaco (Hurwitz *et al.*, 1991; Wald *et al.*, 1991; Aniansson *et al.*, 1994; Lubianca *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012). Asimismo, los factores de riesgo asociados a enfermedades neumocócicas invasivas (IPD, del inglés *invasive pneumococcal disease*) en niños incluyen: (i) edad $<$ de 2 años, (ii) coinfección con virus respiratorios (*e.g.*, virus influenza A), (iii) ausencia de vacunación previa frente a *S. pneumoniae*, (iv) inmunodeficiencias, (v) enfermedades sistémicas concomitantes (*e.g.*, problemas renales, cardíacos o diabetes), (vi) estación del año (siendo más frecuentes en invierno), (vii) contacto indirecto con el humo del tabaco y (viii) permanencia en lugares caracterizados por una elevada concentración de personas (*e.g.*, guarderías y hospitales) (Mehr y Wood, 2012). De forma similar, los factores de riesgo asociados a la neumonía e infecciones neumocócicas invasivas en adultos están relacionados con: (i) la existencia de enfermedades crónicas obstructivas de las vías respiratorias, (ii) una respuesta inmunológica humoral

disminuida, (iii) cirrosis, (iv) diabetes, (v) disfunción esplénica, (vi) infecciones por el virus VIH, (vii) infecciones respiratorias víricas concomitantes y (viii) cáncer. Otros factores de riesgo como el consumo de tabaco, la estación del año (siendo más frecuentes en invierno) y la contaminación del aire también influyen de forma destacable en la aparición de estos procesos (Musher, 1992; Kim *et al.*, 1996; Chavanet, 2012).

Es interesante destacar que, de los aproximadamente 90 serotipos descritos, entre 20 y 23 serotipos parecen ser responsables del desarrollo de infecciones neumocócicas, variando su prevalencia en función del área geográfica, la edad y la localización de la infección (Hausdorff *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2011). Así, los principales serotipos causantes de otitis media a nivel mundial y que, a su vez, con más frecuencia colonizan la nasofaringe de los niños sanos son el 3, 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F, y 23F (Butler *et al.*, 1995; Rodgers *et al.*, 2009). Sin embargo, en lo que respecta a las enfermedades neumocócicas invasivas, los serotipos de mayor importancia a nivel mundial son el 14 y el 6B, a excepción del continente africano, en el que el 1 y el 6A son los más prevalentes (Fig. 2.2) (Reinert *et al.*, 2010; Mehr y Wood, 2012).

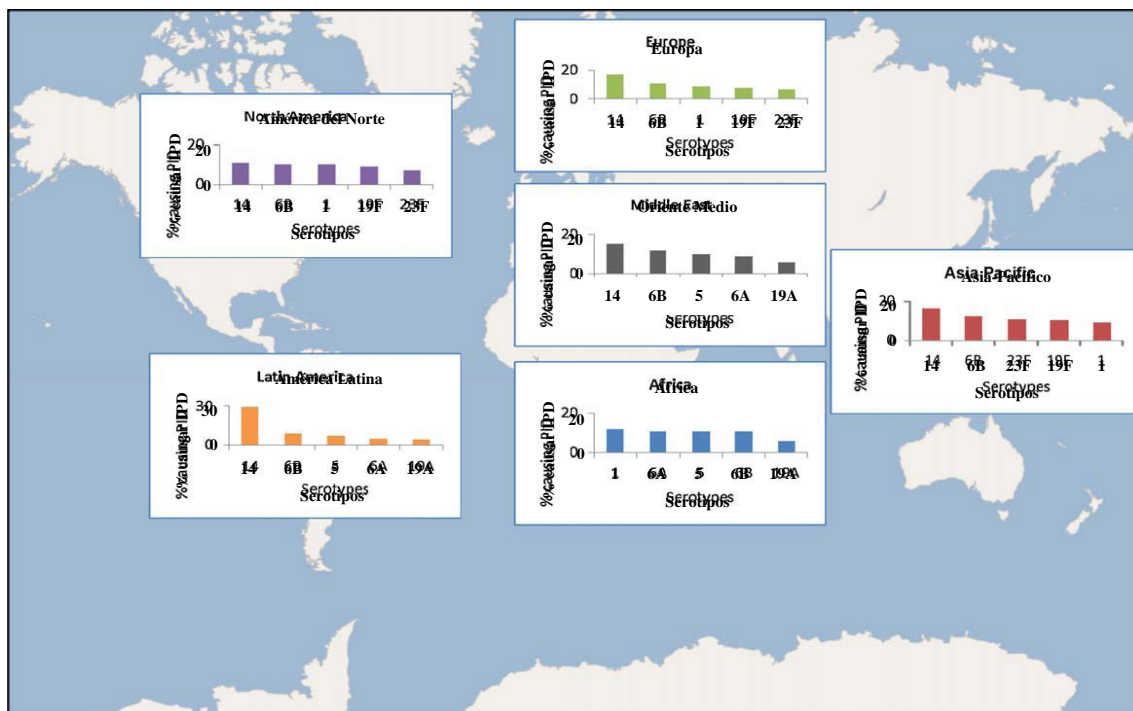


Figura 2.2. Representación gráfica por continente de los cinco serotipos de *S. pneumoniae* aislados con mayor frecuencia de infecciones neumocócicas invasivas (Mehr y Wood, 2012)

Por último, en lo que se refiere a la transmisión de la enfermedad, se desconoce si el contagio de este microorganismo ocurre mediante contacto, aerosoles o pequeñas gotas de saliva. Por otra parte, con respecto a la patogenia de la infección, la primera etapa de la misma consiste en la colonización exitosa de la nasofaringe, lo que depende de la interacción entre la superficie celular del microorganismo y las células del epitelio nasofaríngeo. En el proceso de adhesión participan, además de la cápsula de polisacáridos y la gruesa capa de peptidoglicano

de su superficie, otras moléculas como los ácidos teicoico y lipoteicoico. Sin embargo, se desconoce por qué solo se ven afectadas algunas personas, habiéndose hipotetizado que determinados receptores presentes en las células epiteliales, así como la presencia de las inmunoglobulinas G (IgG) y A (IgA) podrían estar implicados en dicha selectividad. Tras la colonización inicial, el neumococo puede convertirse en invasivo cuando migra desde la nasofaringe y alcanza regiones donde no puede ser eliminado. En la colonización de la trompa de Eustaquio durante la otitis media parece desempeñar un importante papel la actividad neuraminidasa (Linder *et al.*, 1994), mientras que los procesos invasivos a nivel pulmonar y las meningitis parecen estar relacionados con la translocación intracelular de *S. pneumoniae* mediante vesículas que podrían ser las responsables de su transporte a través de las células endoteliales (Ring *et al.*, 1998).

II.1.5.5.3. Virulencia de *S. pneumoniae*

Se ha descrito la existencia de diversos factores de virulencia de *S. pneumoniae* involucrados tanto en la colonización del hospedador como en el tipo y gravedad de las enfermedades producidas (Tabla II.9). De ellos, se considera que la cápsula es el más importante debido fundamentalmente a su actividad antifagocítica, pero también a su función en la colonización y prevención de la eliminación del microorganismo del epitelio por la acción mecánica del mucus; adicionalmente, la cápsula tiene un papel protector en la exposición del neumococo a los antibióticos (Mitchell and Mitchell, 2010). Asimismo, la neumolisina, perteneciente a la familia de las toxinas formadoras de poros, es probablemente el factor de virulencia de *S. pneumoniae* más estudiado, especialmente en lo que respecta a su función en las infecciones respiratorias. Además de su acción citolítica, es capaz de ejercer otras actividades a concentraciones sublétales, tales como la activación del complemento en ausencia de la producción de anticuerpos específicos o la inducción de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (Marriott *et al.*, 2008).

Por otra parte, *S. pneumoniae* tiene la capacidad de formar biopelículas o *biofilms*, lo que le permite eludir mecanismos de defensa del hospedador, tales como la fagocitosis, y reducir su susceptibilidad a los antimicrobianos (Domenech *et al.*, 2013). En este sentido, los microorganismos que se encuentran formando *biofilms* pueden ser hasta mil veces más resistentes a los antibióticos que en estado planctónico. Este incremento en la resistencia se ha atribuido a la dificultad que muestran los agentes antimicrobianos para penetrar el *biofilm*, que suele encontrarse protegido por una matriz polimérica extracelular constituida principalmente por EPS, así como al corto tiempo de duplicación que presentan los microorganismos que se encuentran en este estado (Moscoso *et al.*, 2009). Existen diversos factores moleculares que han sido relacionados con la formación de *biofilms* en *S. pneumoniae*, destacando, entre otros, los siguientes factores de virulencia: LytA, LytB, LytC, CbpA, PcpA y PspA (Moscoso *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque estas moléculas desempeñan un papel importante en el proceso, el mecanismo específico por el cual se produce la formación de estas biopelículas parece estar

Tabla II.9. Principales factores de virulencia descritos en *S. pneumoniae*

Factor de virulencia	Función	Referencia
Cápsula de polisacáridos	Actividad antifagocitaria Favorece la colonización Limita la autólisis Previene la eliminación mecánica por el mucus Protege frente a la acción de los antibióticos	Jonsson <i>et al.</i> (1985); Musher, (1992); Nelson <i>et al.</i> (2007); Van der Poll <i>et al.</i> (2009)
Neumolisina	Acción citolítica Inducción de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno	Boulnois <i>et al.</i> (1991); Marriot <i>et al.</i> (2008)
Pili	Adhesión celular Inducción de la producción de citoquinas pro-inflamatorias	Barocchi <i>et al.</i> (2006); Bagnoli <i>et al.</i> (2008)
Bacteriocinas	Favorecen la colonización	Lux <i>et al.</i> (2007)
Proteínas de superficie LPXTG		
Hialuronidasa	Favorece la colonización Potencia la actividad inflamatoria	Mitchell y Mitchell, (2010)
Neuraminidasa	Interviene en la colonización Implicada en la formación de <i>biofilms</i>	Tong <i>et al.</i> (2000); Parker <i>et al.</i> (2009)
Proteasa PrtA	Implicada en infecciones invasivas	Mirza <i>et al.</i> (2011)
Lipoproteínas		
PsaA	Adhesión celular	Berry y Paton, (1996); Marra <i>et al.</i> (2002)
SlrA	Favorece la colonización	Hermans <i>et al.</i> (2006)
PpmA	Favorece la colonización	Cron <i>et al.</i> (2009)
Proteínas de unión a la colina		
LytA	Implicada en la liberación de la neumolisina Actividad inflamatoria	Tuomanen, (1999); Berry y Paton, (2000)
LytB	Favorece la colonización	Gosink <i>et al.</i> (2000)
LytC	Favorece la colonización	Gosink <i>et al.</i> (2000)
CbpE	Favorece la colonización	Gosink <i>et al.</i> (2000)
PcpA	Adhesión celular	Khan <i>et al.</i> (2012)
PspA	Interfiere en la función del complemento	Ren <i>et al.</i> (2003)
PspC	Interfiere en la función del complemento	Dave <i>et al.</i> (2001)
Otras proteínas de superficie		
PavA	Adhesión celular	Pracht <i>et al.</i> (2005)
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Facilita la trans migración a través de la membrana basal	Eberhard <i>et al.</i> (1999); Bergmann <i>et al.</i> (2004)
Enolasa	Facilita la trans migración a través de la membrana basal	Eberhard <i>et al.</i> (1999); Bergmann <i>et al.</i> (2005)
Proteínas Pht (PhtA, PhtB, PhtD y Pht E)	Interfiere en la función del complemento	Ogunniyi <i>et al.</i> (2009)

vinculada al modelo de regulación por densidad celular conocido como “*quorum sensing*” (QS). Este mecanismo, que incluye la producción de una enzima denominada LuxS, que a su vez sintetiza el autoinductor 2 (AI-2), parece regular la expresión de los genes requeridos para la formación de *biofilms* en *S. pneumoniae* (Vidal *et al.*, 2011).

Finalmente, en la virulencia de *S. pneumoniae* también influye el hecho de que sea una especie naturalmente transformable, es decir, capaz de captar e incorporar ADN de especies relacionadas, como, por ejemplo, *S. mitis* (Johnsborg y Håvarstein, 2009). En este sentido, la publicación de las secuencias nucleotídicas de varias cepas de *S. pneumoniae* ha puesto de manifiesto que su genoma básico consta de 1.400 genes; sin embargo, la cepa tipo TIGR4 presenta aproximadamente 2.300 genes, lo que demuestra la capacidad de los neumococos para alcanzar una gran diversidad genómica (Hiller *et al.*, 2007). El fenómeno de transformación natural se produce cuando las células se encuentran en estado de competencia, lo que les permite captar el ADN foráneo e incorporarlo de manera estable en su cromosoma. El ADN incorporado puede incluir genes que codifican resistencia a antibióticos y/o factores de

virulencia tales como la cápsula. En este sentido, conviene destacar que el hecho de que puedan intercambiarse mediante este mecanismo los determinantes que codifican los más de 90 tipos de cápsula existentes y la consiguiente variabilidad resultante de dicha recombinación tiene implicaciones en el diseño de vacunas basadas en los antígenos capsulares. Asimismo, la adaptabilidad resultante de la plasticidad del genoma de *S. pneumoniae* puede facilitar su respuesta a distintas presiones evolutivas, tales como cambios en el ambiente del hospedador a medida que progresa la enfermedad, o contribuir al desarrollo de la resistencia a antibióticos (Mitchell and Mitchell, 2010).

II.1.5.5.4. Síndromes clínicos ocasionados por *S. pneumoniae*

II.1.5.5.4.1. Otitis media

La otitis media (OM) es una de las enfermedades más comunes en niños, afectando a 7 de cada 10 individuos, de los cuales un tercio sufre episodios repetidos que pueden culminar en otitis media crónica con efusión (OME), patología caracterizada tanto por el fluido que se acumula en el oído medio como por los cambios que sufre su mucosa (Giebink, 2000). Conviene destacar que, aunque *S. pneumoniae* es el principal agente etiológico de esta enfermedad en bebés y niños (20-37%) (Bluestone *et al.*, 1992), otros patógenos como *Haemophilus influenzae* (20%) y, en menor proporción, *Moraxella catarrhalis* (6%), *S. pyogenes* (2%), *St. aureus* (2%) y otros (6%) también pueden ser responsables de la misma (Post *et al.*, 1995; Giebink, 2000). Con respecto a la patogenia de la OM, se ha descrito que *S. pneumoniae* avanza desde la nasofaringe hasta alcanzar la trompa de Eustaquio, donde desarrolla la infección (Walls *et al.*, 2003). Entre los factores contribuyentes a esta patología se han propuesto tanto la existencia de una disfunción de la trompa de Eustaquio causada principalmente por la acción de virus (virus respiratorio sincitial, adenovirus e influenza) (Heikkinen y Chonmaitree, 2003), como anomalías anatómicas. A pesar de que las campañas de vacunación parecen estar ejerciendo un impacto en la incidencia de esta infección en niños, la OM aguda (OMA) sigue siendo la causa principal de las consultas infantiles en atención primaria así como de prescripción de antibióticos entre niños menores de 2 años. Este uso frecuente de antimicrobianos está conduciendo a un incremento de aparición de resistencias en los neumococos que dificultan el tratamiento de la infección y ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos alternativos (McCullers *et al.*, 2007).

II.1.5.5.4.2. Sinusitis

La sinusitis, definida como la inflamación de la mucosa de los senos nasales y paranasales, es uno de los problemas de salud más comunes en niños. Existen diversos factores relacionados con el desarrollo de esta respuesta inflamatoria, entre los que se encuentran las infecciones virales, bacterianas y fúngicas. A este respecto, aunque la infección por virus es la principal causa de esta afección, existe una pequeña proporción de individuos afectados en los que se

desarrolla una infección bacteriana secundaria, siendo *S. pneumoniae* la especie más comúnmente aislada en estos casos (Brook, 2013).

II.1.5.5.4.3. Faringitis y amigdalitis

La faringitis y la amigdalitis son procesos inflamatorios que afectan a la faringe y las tonsilas palatinas (o amígdalas), respectivamente, y que suelen deberse a procesos infecciosos. Ambas infecciones son muy comunes en niños y adultos jóvenes y, en ambos casos, los principales agentes etiológicos son los estreptococos del grupo A (*S. pyogenes*) (Carapetis *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2013). Sin embargo, varios estudios también han relacionado a *S. pneumoniae* con este tipo de infecciones en ambos sectores poblacionales (Savini *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2013).

II.1.5.5.4.4. Neumonía

S. pneumoniae es el principal agente etiológico de las neumonías adquiridas en la comunidad (CAP, del inglés *Community-acquired pneumonia*), es decir, aquellas adquiridas fuera del ambiente hospitalario (File, 2003; Dockrell *et al.*, 2012). Estas infecciones, que se producen debido al avance de *S. pneumoniae* desde la nasofaringe hacia las vías respiratorias bajas, se caracterizan por presentar elevadas tasas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, afectando principalmente a adultos de edad avanzada y a individuos con enfermedades concomitantes (Dockrell *et al.*, 2012). Del mismo modo que en las demás patologías neumocócicas, se han citado como causas predisponentes para la aparición de esta infección factores demográficos, tales como el sexo, la edad y el nivel socio-económico, y el padecimiento de enfermedades concomitantes, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes mellitus e infecciones por *Legionella* spp. (Ishiguro *et al.*, 2013; Postma *et al.*, 2012).

II.1.5.5.4.5. Enfermedades neumocócicas invasivas

Las enfermedades neumocócicas invasivas se caracterizan por el aislamiento de este patógeno de ambientes estériles del organismo, como la pleura, la sangre o el líquido cefalorraquídeo, como resultado de la invasión del epitelio respiratorio (Dockrell *et al.* 2012). Dentro de las enfermedades invasivas producidas por *S. pneumoniae*, responsables de las mayores tasas de mortalidad asociadas a este patógeno, se incluyen la neumonía necrotizante, la meningitis y la bacteriemia. Como se ha mencionado anteriormente, aunque *S. pneumoniae* forma parte de la microbiota comensal del tracto respiratorio superior, en grupos específicos de riesgo puede alcanzar regiones del organismo en las que no puede ser eliminado, desencadenando así enfermedades invasivas (Janoff y Rubins, 1997). A este respecto, una vez alcanzadas las vías respiratorias bajas, puede penetrar a través de las células del epitelio y desencadenar una infección local o bacteriemia. Entre los factores individuales que favorecen el

desarrollo de estas infecciones se encuentran tanto factores inmunológicos como genéticos y del medio ambiente (Janoff y Rubins, 1997).

II.1.5.5.5. Resistencia a antibióticos en *S. pneumoniae*

En los últimos años, el número de aislados de *S. pneumoniae* resistentes a uno o varios antimicrobianos está aumentando de forma alarmante. En este contexto, es especialmente preocupante la elevada prevalencia de la resistencia frente a la familia de los β -lactámicos, que puede llegar al 90% en algunas áreas geográficas. Asimismo, la resistencia a las fluoroquinolonas está comenzando a emerger en países con un elevado consumo de estos antibióticos y altas tasas de resistencia a las mismas en otros microorganismos. También es destacable el hecho de que hasta el 40% de las cepas de *S. pneumoniae* presentan resistencias múltiples (a tres o más familias de antibióticos), siendo su prevalencia también variable en función del área geográfica (Van Bambeke *et al.*, 2007).

II.1.5.5.5.1. Resistencia a los β -lactámicos

Tradicionalmente, las infecciones causadas por *S. pneumoniae* se han tratado con penicilina debido a su elevada sensibilidad frente a este antibiótico (Jacobs, 2004). Sin embargo, actualmente, el aumento del número de aislados resistentes a la misma constituye un verdadero problema a nivel mundial. A pesar de que, inicialmente, las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina se detectaron únicamente en países en los que el uso de estos antibióticos había sido abusivo, su gran capacidad de diseminación provocó que poco tiempo después comenzaran también a detectarse en países con un uso más restringido de los mismos (Hoffmann *et al.*, 1995; Kristinsson, 2000).

La definición de susceptibilidad/resistencia a la penicilina *in vitro* para *S. pneumoniae* fue establecida por el CLSI considerando como puntos de corte las siguientes CMI para la penicilina G: (i) $\leq 0,06$ $\mu\text{g/ml}$, susceptibilidad; (ii) $0,12$ - $1,0$ $\mu\text{g/ml}$, resistencia intermedia, y (iii) $\geq 2,0$ $\mu\text{g/ml}$, alto nivel de resistencia (Pallares *et al.*, 2000). Sin embargo, estos puntos de corte se modificaron para los aislados no productores de meningitis, considerándose como cepas susceptibles, con resistencia intermedia y con alto nivel de resistencia las que presentan CMI para la penicilina G de ≤ 2 , 4 y ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Las cepas de neumococo resistentes a la penicilina suelen presentar asimismo resistencias a otros antibióticos entre los que se incluyen eritromicina, tetraciclina, clindamicina, rifampicina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol (McGee *et al.*, 2001; Van Bambeke *et al.*, 2007). El sector poblacional en el que de forma más habitual se aíslan cepas multirresistentes de *S. pneumoniae* es el de los niños (Klugman, 1990). A este respecto, se conoce que estos portan en su nasofaringe una mayor carga de neumococos que los adultos, lo que unido al uso reiterado de antimicrobianos (principalmente para el tratamiento de la OM) en esta población, favorece las condiciones necesarias para que se produzca la transferencia directa de fragmentos genéticos

entre diferentes cepas, e incluso entre diferentes especies, que permiten la adquisición exitosa de resistencias a los antimicrobianos. En este sentido, el tratamiento con penicilina puede resultar en la reducción de la carga neumocócica sin eliminarla por completo, lo que conduce a la selección de cepas resistentes que colonizan la nasofaringe en coexistencia con las sensibles, favoreciendo el intercambio genético entre ellas (Koornhof *et al.*, 1992; McGee *et al.*, 2000). La resistencia a la penicilina, así como la resistencia a múltiples antimicrobianos, parece estar vinculada a un número determinado de clones pertenecientes a los serogrupos 6, 9, 19 y 23, y al serotipo 14, asociados frecuentemente a los niños (McGee *et al.*, 2001; Reinert *et al.*, 2005; Van Bambeke *et al.*, 2007).

La acción bactericida de la penicilina deriva de su capacidad de inhibir a las PBP encargadas del ensamblaje del peptidoglicano durante la reacción de transpeptidación, lo que resulta en el debilitamiento de la pared bacteriana. Las modificaciones de estas proteínas provocan una disminución en su afinidad por la penicilina y otros β -lactámicos, haciendo necesaria una mayor concentración de los mismos para inhibir su acción (Hakenbeck *et al.*, 2000). A pesar de que pueden producirse mutaciones puntuales en las PBP, la resistencia a los β -lactámicos de los aislados clínicos de *S. pneumoniae* parece deberse a la transferencia genética de determinantes de resistencia de especies que incluyen un mosaico de genes que codifica las PBP (Laible *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992; Van Bambeke *et al.*, 2007).

El análisis evolutivo de *S. pneumoniae* ha revelado que el incremento global de cepas resistentes a la penicilina se debe, al menos, a dos procesos. El primero de ellos se basa en la importación y propagación de un número reducido de clones resistentes con ventajas sobre las cepas locales en un medio natural en el que el uso de antibióticos ha sido excesivo. En este contexto, el clon 23F (*Spain^{23F} clone*), aislado por primera vez en España a principios de la década de los 80, ha alcanzado una rápida difusión a nivel global, habiendo sido aislado posteriormente en EE.UU., México, América Latina, Sudáfrica y Asia, así como en otros países europeos (Muñoz *et al.*, 1991; McGee *et al.*, 1997; Van Bambeke *et al.*, 2007). Por otra parte, la selección *in vivo* de cepas autóctonas con PBP modificadas debido a mutaciones puntuales o, como sucede en la mayoría de los casos, a un intercambio de parte de los genes codificantes de estas proteínas entre especies, constituye otra causa del incremento de cepas resistentes.

Varios estudios han descrito los factores de riesgo relacionados con la infección o transmisión de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina, en los que influyen el tipo de infección y la edad del individuo. Así, la neumonía causada por cepas resistentes a la penicilina en adultos se ha relacionado con: (i) el uso de β -lactámicos en los últimos 3 meses, (ii) hospitalización en los últimos 3 meses y (iii) haber padecido neumonía en el último año (Pallares *et al.*, 1987; Kristinsson, 2000). Por otra parte, los casos de OM en niños causadas por cepas resistentes a la penicilina se han relacionado con: (i) edad temprana, (ii) asistencia a guarderías, (iii) uso reciente de antimicrobianos y (iv) número de tratamientos previos (Kristinsson, 2000). En este contexto, la reducción del consumo de antibióticos, junto con un adecuado control de las

infecciones en guarderías y hospitales, resultan imprescindibles para disminuir la prevalencia de neumococos resistentes a la penicilina (Kristinsson, 2000).

II.1.5.5.2. Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

Los macrólidos se utilizan como agentes de segunda elección (después de los β -lactámicos) para el tratamiento de la CAP (Mandell *et al.*, 2007). El mecanismo de acción de estos antibióticos consiste en la inhibición de la síntesis proteica mediante su unión al centro peptidil-transferasa del dominio V del ARNr 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Dado que este sitio de unión es común para otros grupos de antibióticos como las lincosamidas (*e.g.*, clindamicina) y la estreptogramina b (*e.g.*, quinupristina), la resistencia a los macrólidos puede conferir resistencia cruzada a estos antibióticos (Leclercq, 2002).

Entre los mecanismos de resistencia a los macrólidos descritos en *S. pneumoniae* se encuentran los siguientes: (i) metilación a nivel post-transcripcional del ARNr 23S por la acción de metiltransferasas codificadas por los genes *erm*, y en el caso de *S. pneumoniae*, fundamentalmente por el *erm(B)*, lo que resulta en el bloqueo del sitio de unión de los macrólidos. La monometilación origina resistencia cruzada a todos los macrólidos, la clindamicina, la estreptogramina B y la dalfopristina (Varaldo *et al.*, 2009); (ii) mutaciones en el ARNr 23S y en las proteínas ribosomales L4 y L22 codificadas por los genes *rpID* y *rpIV*. A pesar de que este mecanismo de resistencia no se encuentra frecuentemente en aislados de *S. pneumoniae*, se han descrito casos de fracaso terapéutico asociados al mismo (Cattoir *et al.*, 2007); (iii) expulsión activa mediada por bombas de eflujo consistentes en sistemas de transporte del tipo ABC (del inglés *ATP-Binding Cassette*) compuestas por dos subunidades: la subunidad transmembrana codificada por los genes *mef* y la subunidad anclada en la parte externa de la membrana celular codificada por el gen *mel*, también descrito como *msr(D)* (Daly *et al.*, 2004), y (iv) modificación enzimática del anillo lactónico macrocíclico de los macrólidos por inactivación mediada por esterasas y fosforilasas codificadas por los genes *ere* y *mph(B)*, respectivamente (Sevillano *et al.*, 2006; Varaldo *et al.*, 2009). Por último cabe destacar la emergencia de aislados de *S. pneumoniae* que portan más de un mecanismo de resistencia a los macrólidos, habitualmente los genes *erm(B)* y *mef(E)* (Wierzbowski *et al.*, 2007; De la Pedrosa *et al.*, 2008).

II.1.5.5.3. Resistencia a tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro de acción, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que se emplearon en los países desarrollados antes de la aparición de los β -lactámicos en formulación oral y que se siguen empleando habitualmente en los países en vías de desarrollo. Estos antimicrobianos se caracterizan por sus escasos efectos secundarios y contraindicaciones, así como por su precio relativamente barato (Gómez, 2012). Las tetraciclinas actúan como bacteriostáticos desacoplando la fosforilación oxidativa de los

microorganismos e inhibiendo la síntesis de proteínas en el ribosoma por su unión con la subunidad 30S. En lo que respecta a la resistencia a las tetraciclinas, en *S. pneumoniae* se ha descrito un mecanismo de protección ribosomal asociado a la presencia de los genes *tet(M)* y *tet(O)*, que codifican proteínas que presentan una elevada homología con los factores de elongación implicados en la síntesis de proteínas. La resistencia a estos antimicrobianos se ha diseminado mundialmente debido tanto a su frecuente empleo como a que los genes *tet(M)* se localizan en elementos móviles que, además, suelen llevar asociados genes de resistencia a otras familias de antibióticos (Gómez, 2012).

II.1.5.5.4. Resistencias múltiples

La aparición de resistencia a más de dos grupos de antibióticos en *S. pneumoniae* es relativamente frecuente. En este sentido, lo más común es que se asocien resistencias a β -lactámicos y a macrólidos, estando estas últimas además ligadas a la resistencia a tetraciclinas. La resistencia simultánea a macrólidos y β -lactámicos se ha extendido con éxito debido a la dispersión de clones que portan resistencia a la penicilina y que, a su vez, habían adquirido resistencia a los macrólidos por medio de transposones conjugativos seleccionados por el empleo de dichos antibióticos (Liñares *et al.*, 2010).

II.1.5.5.6. La vacunación como estrategia para el control de las infecciones producidas por *S. pneumoniae*

Como se ha mencionado anteriormente, los cambios en los patrones de virulencia y susceptibilidad a los antibióticos de *S. pneumoniae*, así como el incremento de su difusión en ámbitos tales como las guarderías, representan un problema importante de salud pública. Puesto que en estas condiciones los tratamientos antimicrobianos son cada vez menos efectivos y más costosos, se están realizando numerosos estudios orientados al desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos y profilácticos que permitan minimizar esta problemática. En este contexto, el desarrollo de vacunas frente a *S. pneumoniae* representa hoy en día una estrategia de control fundamental que podría compensar la problemática de las resistencias evitando la propagación de las cepas más virulentas. En este sentido, el sistema inmunitario responde a la infección por *S. pneumoniae* mediante la producción de anticuerpos específicos frente a la cápsula de polisacáridos. Teniendo en cuenta que, aunque se conocen al menos 90 tipos diferentes de cápsulas únicamente 23 son responsables de la mayoría de las infecciones neumocócicas, se desarrolló una vacuna que contiene una mezcla de polisacáridos purificados de estos 23 serotipos (vacuna polisacárida 23-valente, PPSV23) dirigida a la inmunización de la población de riesgo, constituida por adultos mayores de 65 años, niños mayores de 2 años y pacientes con enfermedades renales o cardiovasculares (Janoff *et al.*, 1997). Sin embargo, esta vacuna resultó poco eficaz debido a que su naturaleza exclusivamente polisacáridica conlleva la incapacidad de estimular la respuesta inmunológica T-dependiente (estimulada por antígenos proteicos) y, por tanto, la ausencia de memoria inmunológica (Braido *et al.*, 2008). Esta

limitación es especialmente relevante en niños menores de 2 años debido a la inmadurez de su sistema inmune. Con el objetivo de incrementar la inmunogenicidad, se desarrollaron las denominadas vacunas conjugadas, en las que el polisacárido se encuentra unido a una proteína, lo que permite al primero adquirir el carácter inmunológico de su portador o *carrier*, pudiendo ser reconocido por el sistema inmunitario T-dependiente. A este respecto, la vacuna conjugada heptavalente (PCV7) está compuesta por siete polisacáridos diferentes que representan los serotipos más comúnmente relacionados con la presencia de resistencia a antibióticos y la producción de infecciones invasivas, conjugados con el componente proteico de la toxina diftérica CRM 197 (Braido *et al.*, 2008). Esta vacuna es efectiva en niños menores de 2 años de edad, en los que previene la aparición de enfermedades invasivas causadas por los serotipos vacunales, y a su vez, ejerce protección cruzada frente a otros serotipos pertenecientes a serogrupos incluidos en la vacuna. Sin embargo, debido a que la incidencia de enfermedades causadas por serotipos no incluidos en la vacuna está aumentando (Barricarte *et al.*, 2007), se ha introducido más recientemente nuevas formulaciones, tales como: (i) vacuna neumocócica conjugada decavalente (PCV10) y (ii) vacuna neumocócica conjugada 13-valente (PCV13) (Urueña *et al.*, 2011). Estas vacunas se dirigen a la prevención de las infecciones originadas por los serotipos residuales responsables de las enfermedades invasivas y de enfermedades no invasivas como la OM o la neumonía, así como por los implicados en infecciones causadas por serotipos no incluidos en la vacuna heptavalente en niños de hasta 5 años de edad (Weil-Olivier *et al.*, 2012). En la Tabla II.10 se indican los serotipos incluidos en cada una de las vacunas antineumocócicas citadas anteriormente.

Tabla II.10. Serotipos de *S. pneumoniae* incluidos en las vacunas antineumocócicas

Vacuna	Serotipos ^a
Vacuna polisacárida 23-valente (PPSV23)	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F
Vacuna conjugada heptavalente (PCV7)	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F
Vacuna conjugada decavalente (PCV10)	1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F
Vacuna conjugada 13-valente (PCV13)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F

^aSistema de nomenclatura danés.

Conviene destacar que la vacunación también presenta limitaciones. Así, por ejemplo, aunque la utilización de la vacuna heptavalente permitió una disminución de la incidencia de infecciones invasivas neumocócicas (Ampofo *et al.*, 2011; Yildirim *et al.*, 2012), ello conllevó un aumento significativo paralelo de los casos de infección producidos por serotipos no incluidos en esta vacuna (Jacobs *et al.*, 2008). En EE. UU., los serotipos prevalentes antes de la introducción de la vacunación eran el 14 y el 6B, mientras que en la actualidad se mantiene el 14 y ha aumentado significativamente el 19A. En España, la prevalencia de ciertos serotipos

vacunales ha disminuido significativamente entre los periodos 1997-2001 y 2007-2008 y, sin embargo, la prevalencia del serotipo 14 ha permanecido estable y también se ha observado un aumento significativo del serotipo 19A (Liñares *et al.*, 2010). La prevalencia del serotipo 19A ha aumentado de forma general en todos los países, incluidos aquellos en los que el acceso a la vacunación no es universal. Este hecho, unido a que estos aislados no sólo son resistentes a la penicilina, sino que suelen vehicular más resistencias asociadas (principalmente a macrólidos), hace pensar que la vacunación ha sido un factor, añadido a otros como el consumo elevado de antibióticos, que ha contribuido a su diseminación. Además de este serotipo, los serotipos 1, 3, 5, 7F, 15A, 23A, 35B y el recientemente descrito 6C (Fenoll *et al.*, 2009; Gertz *et al.*, 2010) han aumentado tras la introducción de la vacuna conjugada heptavalente. Finalmente, con la reciente introducción en el mercado de la nueva vacuna conjugada 13-valente, que además de los serotipos incluidos en la vacuna heptavalente (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) incluye los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A, es de esperar que se sigan produciendo cambios en la dinámica poblacional de *S. pneumoniae* (Gómez, 2012).

Por lo tanto, los estudios realizados después de la instauración de programas vacunales en distintos países han puesto de manifiesto las siguientes limitaciones de la vacunación frente a *S. pneumoniae*: (i) elevado coste de producción y acceso limitado a las vacunas en los países en vías de desarrollo; (ii) necesidad de diferentes formulaciones, dosis y combinación de serotipos atendiendo a la diversidad poblacional, la edad y el área geográfica; (iii) problemas relacionados con el desarrollo de tolerancia inducida por el *carrier*, y (iv) cobertura de las vacunas atendiendo a la posibilidad de que los serotipos más virulentos cambien con el tiempo (Klein, 1999). Todos estos factores subrayan la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones producidas por *S. pneumoniae*.

II.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL

Los péptidos con actividad antimicrobiana se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo producidos por una gran variedad de organismos pertenecientes a los tres dominios de los seres vivos (*Eucarya*, *Archaea* y *Bacteria*), entre los que se incluyen animales vertebrados e invertebrados (mamíferos, aves, anfibios, peces, crustáceos e insectos), plantas y microorganismos (arqueas, bacterias y hongos) (Hancock *et al.*, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Hancock y Chapple, 1999; Dutton *et al.*, 2002; Diep y Nes, 2002; O'Connor y Shand, 2002; Papagianni, 2003; Cederland *et al.*, 2011; Sperstad *et al.*, 2011; Bakkal *et al.*, 2012; Vilcinskis *et al.*, 2013). Estos péptidos presentan una serie de propiedades que los convierten en efectivos agentes defensivos, entre las que destacan: (i) su toxicidad selectiva frente a las células diana; (ii) su rápida acción; (iii) su amplio espectro de acción, y (iv) su escasa capacidad para inducir resistencias (Matsuzaki, 1999; Zasloff, 2002). Hasta la fecha, se han descrito y caracterizado una gran variedad de péptidos antimicrobianos que, según su mecanismo de biosíntesis, se clasifican en dos grandes grupos: (i) péptidos de síntesis no ribosomal, entre los

que se incluyen diversos antibióticos (*e.g.*, polimixinas, bacitracinas y glicopéptidos) producidos por bacterias y hongos, y (ii) péptidos de síntesis ribosomal, producidos por especies pertenecientes a los dominios *Eucarya*, *Archaea* y *Bacteria*, denominados eucariocinas, arqueocinas y bacteriocinas, respectivamente (Hancock *et al.*, 1995; Epand y Vogel, 1999; Hancock y Chapple, 1999; Dutton *et al.*, 2002; O'Connor y Shand, 2002; Lüders *et al.*, 2003; Bakkal *et al.*, 2012; Yount y Yeaman, 2013). En el caso de los organismos eucariotas superiores, la mayoría de los péptidos antimicrobianos se localizan en las mucosas y superficies corporales, constituyendo la primera línea de defensa natural y formando parte de la inmunidad innata.

Aunque, de forma general, los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal muestran una escasa homología en su estructura primaria, presentan como características comunes su pequeño tamaño molecular (aprox., 20–60 residuos aminoácidos) y su naturaleza catiónica y anfipática (presencia en su estructura de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas), responsable de su capacidad para interactuar con las membranas citoplasmáticas de las células sensibles (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Matsuzaki, 1999; Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Baltzer y Brown, 2011; Cederland *et al.*, 2011). En lo que respecta al modo de acción de estos péptidos, a pesar de que tradicionalmente se ha considerado que su acción letal se basa en la desestabilización de las membranas y su consiguiente despolarización, lo que conduce en última instancia a la muerte celular (Cleveland *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Baltzer y Brown, 2011), también se han descrito péptidos capaces de interactuar con dianas intracelulares (Nissen-Meyer y Nes 1997; Hancock y Rozek, 2002; Cotter *et al.*, 2013). A este respecto, se han sugerido como potenciales dianas la maquinaria implicada en la división celular, la síntesis de proteínas, ADN o ARN y/o la involucrada en la activación autolítica (Hancock y Rozek, 2002; Zasloff, 2002; Bagley *et al.*, 2005; Metlitskaya *et al.*, 2006; Parks *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2009).

Los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por células eucariotas y bacterias presentan diferencias en cuanto a actividad, espectro de acción y potencia. Así, mientras que la actividad de los péptidos antimicrobianos eucarióticos puede dirigirse tanto a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (actividad antimicrobiana) como a células eucariotas (actividad quimiotáctica y proinflamatoria), los péptidos antimicrobianos bacterianos únicamente suelen presentar actividad antimicrobiana y un espectro de acción reducido, en el que se incluyen principalmente especies y géneros relacionados con la cepa productora. Por otra parte, los péptidos antimicrobianos bacterianos son activos a concentraciones del orden nanomolar, por lo que su potencia es superior a la de los péptidos antimicrobianos eucarióticos, que ejercen su actividad a concentraciones del orden micromolar (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Diep y Nes, 2002; Dutton *et al.*, 2002). Por último, conviene destacar que la caracterización de péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal, que en algunos casos pueden además ejercer actividad inmunológica, antitumoral, antifúngica y/o antivírica, presenta una especial relevancia en un contexto en el que la rápida emergencia de poblaciones bacterianas resistentes a numerosos antibióticos en especies con un elevado potencial patogénico requiere el desarrollo

de nuevos compuestos que proporcionen una protección más eficaz frente a las infecciones bacterianas, además de por su posible empleo como bioconservantes en la industria alimentaria (Bechinger, 1999; Eband y Vogel, 1999; Lohner y Prenner, 1999; Moll *et al.*, 1999; Pag y Sahl, 2002b; Twomey *et al.*, 2002; Baltzer y Brown, 2011).

II.2.1. BACTERIOCINAS

II.2.1.1. DEFINICIÓN

El concepto del término “bacteriocina” ha evolucionado paulatinamente desde que, durante la primera mitad del siglo XX, diversos investigadores lo propusieran para englobar a las diferentes sustancias antimicrobianas de origen bacteriano del tipo de las colicinas, caracterizadas por: (i) su capacidad de adsorción a receptores de membrana específicos; (ii) su actividad inhibidora restringida a especies filogenéticamente próximas; (iii) su biosíntesis letal; (iv) su naturaleza proteica; (v) su modo de acción bactericida, y (vi) la localización plasmídica de los determinantes genéticos que codifican su producción e inmunidad (Jacob *et al.*, 1953). Posteriormente, considerando las diferentes características de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, Tagg *et al.* (1976) las definieron como “sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica activas frente a bacterias con una estrecha relación filogenética con la especie productora”. Sin embargo, dado que algunas bacteriocinas poseen actividad bactericida frente a microorganismos alejados taxonómicamente de las especies que las producen, Konisky (1982) las definió como “agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora”. En los últimos años, se ha producido un extraordinario avance en la investigación sobre las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas y, principalmente, de las bacterias lácticas, lo que ha permitido elucidar su estructura, sus características físico-químicas, su modo de acción, la localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos de biosíntesis, transporte, procesamiento, inmunidad y regulación de su producción (sección II.2.2). Como consecuencia de todo ello, Klaenhammer (1988) las definió como “un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza proteica que varían en su espectro antimicrobiano, modo de acción, tamaño molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas”. De manera similar, Jack *et al.* (1995) las definieron como “un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas bacterianas de síntesis ribosomal que se secretan al medio extracelular, con o sin modificaciones postraduccionales, y que poseen un espectro de acción antimicrobiano que puede ser reducido y limitado, al menos, a algunas cepas de su misma especie”. Por último, Stiles (1996) definió a las bacteriocinas como “sustancias cuyas únicas características comunes son su carácter proteico y su actividad antimicrobiana”. En definitiva, las bacteriocinas son péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) (Joerger *et al.*, 2000; O’Keeffe y Hill, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Hill y O’Keeffe, 2003; Gálvez *et al.*, 2007; Nishie *et al.*, 2012; Cotter *et al.*, 2013).

II.2.1.1.1. Bacteriocinas vs. antibióticos

Aunque las bacteriocinas y los antibióticos tienen en común su capacidad para inhibir el desarrollo de determinados microorganismos, estos compuestos presentan diferencias en su composición, síntesis, espectro antimicrobiano, modo de acción y mecanismos de inmunidad, resistencia y/o toxicidad (Tabla II.11). Estas características diferenciales convierten a las bacteriocinas en candidatos interesantes para su empleo como estrategia complementaria o alternativa a los antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas (Cleveland *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Además, resulta importante diferenciar ambos grupos antimicrobianos debido al potencial empleo de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas como bioconservantes alimentarios (sección II.2.7.2.1).

Tabla II.11. Principales diferencias entre las bacteriocinas y los antibióticos

	Bacteriocinas	Antibióticos
Naturaleza	Proteica	Variable, en ocasiones proteica
Síntesis	Metabolitos primarios Ribosomal, generalmente como precursores inactivos	Metabolitos secundarios No ribosomal (complejos multi-enzimáticos)
Espectro de actividad antimicrobiana	Variable Generalmente espectro reducido (especies relacionadas filogenéticamente)	Variable Afectan a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y a células eucariotas
Modo de acción	Generalmente mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática En ocasiones, inhiben la síntesis de la pared bacteriana, proteínas, ADN y ARN	Inhiben diversas funciones celulares (<i>e.g.</i> , síntesis de la pared bacteriana, proteínas, ADN y ARN)
Requerimientos para la interacción con la célula diana	En ocasiones, receptores específicos o moléculas <i>docking</i> (que facilitan su interacción con las dianas celulares de las células sensibles)	Receptores específicos
Inmunidad de la célula productora	Codificada por los genes de inmunidad	No descrita
Resistencia/tolerancia	Generalmente por modificaciones en la composición de la membrana	Genes de resistencia específicos y transferibles, transportadores de resistencia a múltiples fármacos, mutaciones en las dianas celulares
Toxicidad/efectos colaterales	No descritos	Variables (<i>e.g.</i> , diarreas, reacciones alérgicas y fotosensibilización)
Aplicación	Alimentos ^a y clínica	Clínica

^aLa aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios únicamente se ha propuesto para las producidas por las bacterias lácticas, habiéndose autorizado internacionalmente solamente la nisina como aditivo alimentario. Adaptado de Cleveland *et al.* (2001) y Nes *et al.* (2002).

II.2.1.2. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS vs. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

La capacidad de producir bacteriocinas (bacteriocinogenicidad) es un rasgo fenotípico muy extendido entre las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas; no obstante, como se resume en la Tabla II.12, las bacteriocinas producidas por cada uno de estos grupos de microorganismos presentan características específicas en lo que se refiere a su tamaño molecular, estructura, espectro y modo de acción, organización genética, mecanismo de secreción, inmunidad y regulación de su producción.

Tabla II.12. Características diferenciales de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas

	Gram-negativas ^a	Gram-positivas ^a
Tamaño molecular	Generalmente elevado (proteínas) Variable según el modo de acción (5-80 kDa)	Generalmente pequeño (péptidos) Variable (2-35 kDa)
Espectro de actividad	Reducido, generalmente reducido a especies estrechamente relacionadas filogenéticamente	Generalmente restringido a bacterias Gram-positivas Variable: reducidos (<i>e.g.</i> lactococinas A, B, y M) o amplio (<i>e.g.</i> nisina y pediocina PA-1)
Producción	Letal para la célula productora Regulado por genes reguladores inducidos por condiciones que inducen la respuesta SOS	No letal para la célula productora Ocasionalmente regulada por sistemas de regulación específicos Principalmente entre la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria
Organización genética	Gen estructural Gen de inmunidad Gen de lisis celular	Gen(es) estructural(es) Gen(es) de modificaciones postraduccionales Gen de transporte y procesamiento Gen(es) de inmunidad Genes de regulación
Localización de los genes	Generalmente en plásmidos	Plásmidos, cromosoma y transposones
Transporte	Generalmente a través de la lisis celular Ocasionalmente a través de transportadores del tipo ABC	Generalmente a través de transportadores del tipo ABC Ocasionalmente mediante el sistema Sec
Dominios	Dominio N-terminal (translocación) Dominio central (unión al receptor) Dominio C-terminal (lisis e inmunidad)	Dominio N-terminal (unión a la membrana) Dominio C-terminal (inserción en la membrana)
Modo de acción	Formación de poros en las membranas celulares Actividad nucleasa frente a ADN, ARNr y ARNt	Generalmente a través de formación de poros en las membranas celulares
Clasificación	Colicinas (25-80 kDa): subgrupo de colicinas formadoras de poros y colicinas con actividad nucleasa Microcinas (<10 kDa): clases I (<5 kDa) y II (7-10 kDa) Piocinas: tipos R, F y S Bacteriocinas activas frente a patógenos de plantas: caratovoricina y serracina P	Clase I (lantibióticos) (<5 kDa): subclases A y B Clase II (no lantibióticos) (<10 kDa): subclases IIa, IIb, IIc, IId y IIE Clase III (>30 kDa)

^aLas características se refieren al grupo de las colicinas (prototipo de las bacteriocinas producidas por Gram-negativas). Adaptado de Criado (2006).

II.2.1.2.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que varían en tamaño molecular, modo de acción y mecanismo de inmunidad (Riley y Wertz, 2002). Dentro de este grupo, las producidas por la familia *Enterobacteriaceae* son las mejor caracterizadas, habiéndose clasificado en dos grupos principales: (i) colicinas, que constituyen el prototipo de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y (ii) microcinas (Pons *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Por otra parte, las piocinas constituyen el grupo de bacteriocinas producidas por bacterias del género *Pseudomonas* (Michel-Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Finalmente, existe otro grupo de bacteriocinas no caracterizadas totalmente, entre las que se encuentran la caratovoricina,

serracina P y glicinicina A, producidas por *Erwinia carotovora* subesp. *carotovora*, *Serratia phymithicum* y *Xanthomonas campestris*, respectivamente, que son activas frente a microorganismos patógenos de las plantas (Fett y Maher, 1985; Heu *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2001; Jabrane *et al.*, 2002; Holtsmark *et al.*, 2008). Las colicinas son bacteriocinas producidas por *Ec. coli* caracterizadas por: (i) su tamaño molecular relativamente elevado (25–80 kDa); (ii) la estimulación de su producción por condiciones de estrés que inducen la respuesta SOS (*e.g.*, niveles reducidos de oxígeno y nutrientes); (iii) su síntesis generalmente letal para la célula productora; (iv) su interacción con las células diana a través de receptores específicos de la superficie celular; (v) su estructura en tres dominios (*i.e.*, N-terminal, central y C-terminal) implicados en la translocación de la bacteriocina al interior de la célula diana, la interacción con el receptor y la lisis celular e inmunidad, respectivamente; (vi) la localización plasmídica de las agrupaciones génicas que codifican su producción e inmunidad, y (vii) su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Ec. coli* y *Salmonella* spp. (Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Gillor *et al.*, 2005; Cascales *et al.*, 2007). Los genes necesarios para la producción de las colicinas son: (i) gen estructural, que codifica la bacteriocina; (ii) gen de inmunidad, que codifica una proteína que confiere inmunidad a la célula productora mediante su unión a la colicina y posterior inactivación de esta, y (iii) gen de lisis, que codifica una proteína implicada en la liberación de la colicina mediante la lisis de la célula productora. Según su modo de acción, estas moléculas se clasifican en dos grupos: (i) colicinas con actividad formadora de poros en la membrana bacteriana y (ii) colicinas con actividad nucleasa sobre ADN, ARNr y ARNt (Joerger *et al.*, 2000; Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Gillor *et al.*, 2005; Cascales *et al.*, 2007). Asimismo, las colicinas también pueden clasificarse en dos grupos en función de su mecanismo de transporte y secreción: (i) A, translocadas por el sistema Tol y secretadas al medio, y (ii) B, translocadas por el sistema TonB y no secretadas.

Por otra parte, las microcinas son bacteriocinas producidas por *Ec. coli* (aunque también se ha descrito una producida por *Klebsiella pneumoniae*) caracterizadas por: (i) su tamaño molecular relativamente pequeño (<10 kDa); (ii) su producción no dependiente del sistema SOS; (iii) su síntesis no letal para la célula productora; (iv) su secreción durante la fase de crecimiento exponencial; (v) su modo de acción mediante la formación de poros en la membrana celular o la desestabilización del potencial de membrana, y (vi) un espectro de acción frente a enterobacterias más amplio que el de las colicinas. Las microcinas pueden agruparse en dos clases: (i) I, constituida por microcinas de tamaño molecular <5 kDa, con modificaciones postraduccionales y que ejercen su actividad antimicrobiana sobre dianas intracelulares (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2002), y (ii) II, que incluye las microcinas de mayor tamaño molecular (7–10 kDa) y que, a su vez, se subdivide en 2 subclases: IIa, integrada por microcinas caracterizadas por la ausencia de modificaciones postraduccionales, la posible presencia de puentes disulfuro y su actividad sobre la membrana citoplasmática y IIb, que incluye microcinas lineales que sufren una modificación postraduccional en su extremo C-terminal (Duquesne *et al.*, 2007; Azpiroz *et al.*, 2009; Budič *et al.*, 2011). Conviene destacar que las microcinas de la

subclase IIa comparten algunas propiedades con las bacteriocinas de la clase IIa producidas por las bacterias lácticas (sección II.2.2.2), entre las que destacan: (i) su pequeño tamaño molecular; (ii) su termorresistencia; (iii) su hidrofobicidad; (iv) su síntesis como precursores inactivos (prebacteriocina); (v) la presencia de extensiones N-terminales del tipo secuencia líder; (vi) su secreción mediante transportadores del tipo ABC (del inglés, *ATP Binding Cassette*); (vii) la ausencia de modificaciones postraduccionales, y (viii) su actividad sobre la membrana (Pons *et al.*, 2002).

Finalmente, las piocinas son bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* con las siguientes características: (i) las agrupaciones génicas que codifican su producción se encuentran en el cromosoma y están constituidas por un gen estructural, un gen de inmunidad y, en algunos casos, un gen de lisis; (ii) su expresión está inducida por agentes mutagénicos (*e.g.*, radiación ultravioleta y mitomicina C) que inducen la respuesta SOS, y (iii) su espectro de acción está limitado a cepas de la misma especie y algunas bacterias Gram-negativas (*e.g.*, *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp.) (Duport *et al.*, 1995; Michel-Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005).

II.2.1.2.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas

Como se muestra en la Tabla II.12, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas presentan una serie de características diferenciales con respecto a las producidas por bacterias Gram-negativas, tales como: (i) su síntesis no letal para la célula productora, ya que el transporte está mediado generalmente por sistemas de transporte específicos y, ocasionalmente, por el sistema Sec (también denominado Ruta General de Secreción) (sección II.2.2.5.3.2); (ii) su síntesis está mediada generalmente por sistemas de regulación específicos para cada bacteriocina; (iii) su producción está asociada generalmente al final de la fase de crecimiento exponencial y el comienzo de la fase estacionaria, y (iv) su espectro de acción antimicrobiana es variable, pero generalmente está restringido a otras bacterias Gram-positivas (Riley y Wertz, 2002). El heterogéneo grupo de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, cuyas características principales se describen en la siguiente sección, constituye el prototipo de las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas.

II.2.2. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de síntesis ribosomal que varían en sus propiedades físico-químicas, espectro de acción antimicrobiana, modo de acción, mecanismos responsables de su inmunidad, biosíntesis, procesamiento, transporte y regulación de su producción y en la organización molecular de los determinantes genéticos implicados en estos procesos. Durante los últimos años, debido a la posible aplicación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas como agentes terapéuticos o en la bioconservación de los alimentos (secciones II.2.2.7.1 y II.2.2.7.2.1,

respectivamente), se ha producido un extraordinario avance en la investigación de estos compuestos, lo que ha permitido elucidar su estructura, sus características físico-químicas, su modo de acción, la localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos de biosíntesis, procesamiento, secreción, inmunidad y regulación de su producción (Cintas *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2010; Bakkal *et al.*, 2012; Nes *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

II.2.2.1. CLASIFICACIÓN

A pesar de su heterogeneidad, las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas presentan una serie de características comunes que permiten agruparlas en alguna de las siguientes clases (Nes *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006, Nishie *et al.*, 2012):

1. Clase I (lantibióticos). Bacteriocinas policíclicas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), termoestables y con aminoácidos poco usuales resultantes de modificaciones postraduccionales como: (i) deshidratación de residuos de serina (Ser) y treonina (Thr), con la consiguiente formación de deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb), respectivamente, y (ii) condensación de residuos Dha y Dhb con grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína (Cys) cercanos, lo que origina lantionina (Lan) y β -metil-lantionina (MeLan), respectivamente (Sahl y Bierbaum, 1998; Twomey *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2005; Knerr y Van der Donk, 2012). El prototipo de esta clase es la nisina A (NisA), que, además, es la bacteriocina mejor caracterizada hasta la fecha y la única aceptada internacionalmente como aditivo alimentario para determinados tipos de alimentos (sección II.2.2.7.2.1) (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Davies y Delves-Broughton, 2000; Cheigh y Pyun, 2005; Healy *et al.*, 2013). En función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen, a su vez, en dos grupos:
 - a. Tipo Ia. Lantibióticos elongados, flexibles y catiónicos que actúan formando poros en la membrana plasmática. Este grupo se subdivide a su vez en: (i) subgrupo Ia1, que incluye los lantibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo FNLDV (sección II.2.2.5.1), es procesada por una serín-proteasa (*e.g.*, NisA y nisina Z [NisZ]), y (ii) subgrupo Ia2, que incluye los lantibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo “doble glicina” (sección II.2.2.5.1), es procesada por un transportador del tipo ABC, como es el caso de la lacticina 481 [Ltn481] y todos los sistemas de dos péptidos (*e.g.*, citolisina [Cyl]), cuya actividad total depende de la acción complementaria de dos péptidos con actividad antimicrobiana débil de manera individual, pero potente cuando actúan conjuntamente (Nagao *et al.*, 2006; Lawton *et al.*, 2007; Smith y Hillman, 2008).
 - b. Tipo Ib. Lantibióticos globulares, aniónicos o neutros e hidrófobos, inmunológicamente activos que actúan como inhibidores de enzimas (*e.g.*,

mersacidina, cinamicina, actagardina y duramicinas B y C). Conviene destacar que, hasta la fecha, no se ha descrito ningún lantibiótico de este tipo producido por bacterias lácticas (Skaugen *et al.*, 2003).

2. Clase II (no lantibióticos). Bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables, con un punto isoelectrico elevado (pI 8–11), sin aminoácidos modificados postraduccionalmente y que actúan en la membrana citoplasmática (Nes y Holo, 2000; Nes *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Kjos *et al.*, 2011b). Tradicionalmente, las bacteriocinas de la clase II se han subdividido en tres grupos:

- a. Subclase IIa (bacteriocinas del tipo/familia de la pediocina). Bacteriocinas con una potente actividad anti-*Listeria* y un elevado grado de homología estructural (40–60%), especialmente en la región N-terminal, en la que se incluye la secuencia consenso conservada YGNGVXCX₄CXV (donde X representa un residuo aminoacídico no conservado) que incluye dos residuos de Cys que forman un puente disulfuro esencial para la actividad antimicrobiana (Ennahar *et al.*, 1999, 2000; Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2012). El espectro de acción de las bacteriocinas de esta subclase es muy amplio e incluye generalmente tanto a otras bacterias lácticas como a microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (*Bacillus* spp., *Brochothrix* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. y *Staphylococcus* spp.). El prototipo de este grupo es la pediocina PA-1 (PedPA-1) (Henderson *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1998b), que es la bacteriocina de las bacterias lácticas mejor caracterizada después de NisA.
- b. Subclase IIb (sistemas de dos péptidos). Bacteriocinas cuya actividad antimicrobiana total depende de la acción complementaria de dos péptidos (Cintas *et al.*, 1998a; Garneau *et al.*, 2002; Oppegård *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2010). Estos sistemas se clasifican, a su vez, en dos tipos: (i) sistemas en los que los dos péptidos no poseen actividad antimicrobiana independiente, por lo que es necesaria su presencia simultánea para que la bacteriocina sea activa (*e.g.*, lactococina G [α y β]; LcnG [Lcn α y Lcn β]), y (ii) sistemas en los que uno o ambos péptidos son activos independientemente, pero cuya actividad aumenta notablemente en presencia del otro péptido (*e.g.*, lactacina F [A y B] y enterocina L50 [L50A y L50B], respectivamente).
- c. Subclase IIc. Bacteriocinas de la clase II que no se incluyen en ninguna de las subclases anteriores (*e.g.*, carnobacteriocina A [CbnA], enterocina B [EntB] y enterocina Q [EntQ]).

3. Clase III. Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles (inactivadas con tratamientos térmicos a 60–100°C durante 10–15 min) (*e.g.*, helveticina J y enterolisina A [EnIA]).

Por otra parte, Kemperman *et al.* (2003) sugirieron la existencia de una nueva clase constituida por bacteriocinas con una estructura cíclica resultante de la formación de un enlace peptídico entre las regiones N- y C- terminal de la molécula y que no presentan aminoácidos modificados postraduccionalmente (*e.g.*, circularina A [CirA], enterocina AS-48 [EntAS-48], gassericina A [GasA], reutericina 6 y garvicina ML [GarML]) (Kawai *et al.*, 2004; Maqueda *et al.*, 2004, 2008; Borrero *et al.*, 2011a); no obstante, estas bacteriocinas también han sido consideradas como una subclase de la clase II (Cotter *et al.*, 2005b; Nes *et al.*, 2007). Asimismo, Cotter *et al.* (2005b) designaron a todos los compuestos termolábiles y de elevado tamaño molecular, tradicionalmente agrupados en la clase III, como bacteriolisinas (hidrolasas de la mureína), excluyéndolos así del grupo de las bacteriocinas, ya que difieren de las bacteriocinas tradicionales en: (i) su mecanismo de acción, que consiste en la lisis celular mediante la hidrólisis de la pared bacteriana; (ii) su estructura modular, compuesta por un dominio N-terminal catalítico con homología con endopeptidasas y un dominio C-terminal implicado en el reconocimiento de su diana celular y (iii) la posible ausencia de gen(es) de inmunidad en sus operones, por lo que la inmunidad de la célula productora podría depender de modificaciones en su pared bacteriana. Por otra parte, Nes *et al.* (2007) clasificaron a las bacteriocinas en dos grandes grupos (clase I, lantibióticos y clase II, no lantibióticos) y, a su vez, las pertenecientes a la clase II las subdividieron en cuatro subclases: (i) IIa (bacteriocinas del tipo/familia de la pediocina); (ii) IIb (sistemas de dos péptidos); (iii) IIc (bacteriocinas sin extensión N-terminal) y (iv) IId (bacteriocinas con estructura cíclica). No obstante, De Vuyst y Leroy (2007) agruparon a las bacteriocinas de la clase II en sólo tres subclases: (i) IIa (bacteriocinas del tipo/familia de la pediocina); (ii) IIb (sistemas de dos péptidos) y (iii) IIc (bacteriocinas con estructura cíclica); sin embargo Van Belkum y Stiles (2000) propusieron una subdivisión de la clase II en seis subclases. Recientemente, Zouhir *et al.* (2010) propusieron una clasificación basada en una nueva caracterización de las secuencias según su estructura, lo cual permite agrupar las bacteriocinas en 12 grupos. Por último, Cui *et al.* (2012) propusieron clasificar a las bacteriocinas de la clase IIa en ocho subgrupos en función de su secuencia consenso conservada, su estructura 3D y su mecanismo de acción. De todo lo descrito anteriormente, se desprende la existencia de numerosas discrepancias a la hora de clasificar las bacteriocinas, lo que es debido tanto a la diversidad bioquímica de las mismas como a los criterios seleccionados para su clasificación, por lo que esta es una tarea que todavía no se ha resuelto de forma unánime y satisfactoria. En este trabajo se propone una clasificación de las bacteriocinas basada en las propuestas por Diep y Nes (2002) y Nes *et al.* (2007) (Tabla II.13).

Tabla II.13. Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas

Clase	Características generales	Subclase	Características particulares	Ejemplos
I	Lantibióticos: péptidos de pequeño tamaño molecular (<5 kDa) con aminoácidos modificados postraduccionamente (Dha, Dhb, Lan y MeLan)	Ia1	Péptidos elongados y flexibles procesados por una serín-proteasa	Lactocina S NisA y NisZ
		Ia2	Péptidos elongados y flexibles Sistemas de dos péptidos	Ltn 481 Lactocina S Plantaricina C Lactocina 3147 (α y β) Lcn G (α y β) Plantaricina W (α y β) Cyl (L_L y L_S)
II	No lantibióticos: péptidos de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables y con una potente actividad anti- <i>Listeria</i>	IIa	Secuencia consenso N-terminal YGNGVXCX ₄ CXV ^a	PedPA-1/Pediocina AcH Sakacinas A y P Enterocinas A y P
		IIb	Sistemas de dos péptidos	Sakacina T (T_α y T_β) Lactacina F (A y B) Plantaricinas EF y JK EntL50 (EntA y EntB)
		IIc	Sin extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal)	EntL50 (EntA y EntB), EntQ y EntEJ97
		IId	Estructura cíclica	GasA EntAS-48 GarML
		IIe	Otros péptidos de la clase II	CbnA Enterocina B Lactococina A Sakacina Q
III	Proteínas termosensibles de elevado tamaño molecular (>30 kDa)	-	-	Helveticina J Lactacina A EnLA

^aX representa un residuo aminoacídico no conservado. Adaptado de Diep y Nes (2002) y Nes et al. (2007).

II.2.2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y ESTRUCTURA

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas tienen una naturaleza peptídica y, por lo tanto, se inactivan presumiblemente por la acción de enzimas proteolíticas de origen gástrico (pepsina) y/o pancreático (tripsina y quimiotripsina) (Gänzle *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2005b). Esta propiedad es interesante desde el punto de vista de la seguridad de estos compuestos, ya que, en el caso de emplearse como bioconservantes en la industria alimentaria o como agentes terapéuticos en el tratamiento local de infecciones de la cavidad oral y de la nasofaringe (secciones II.2.2.7.2 e II.2.2.7.1, respectivamente), la ecología microbiana del tracto digestivo de los consumidores no resultaría afectada a diferencia de lo que sucede frecuentemente con la terapia antibiótica (Bernbom *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010).

En lo que respecta a su composición aminoacídica, como ya se ha mencionado, los lantibióticos (clase I) constituyen una clase especial de bacteriocinas policíclicas caracterizadas por la presencia de aminoácidos modificados postraduccionamente (Dha, Dhb, Lan y MeLan). Por otra parte, las bacteriocinas de las clases II y III carecen de modificaciones postraduccionales, con la excepción de la formación de una estructura cíclica en EntAS-48

(bacteriocina Bac21) (Martínez-Bueno *et al.*, 1994), CirA, GasA, reutericina 6 y GarML, y del establecimiento de puentes disulfuro entre los residuos Cys (2–4 Cys: 1–2 puentes disulfuro) de las bacteriocinas de la clase IIa (Casaus, 1998; Eijsink *et al.*, 1998). A este respecto, Klaenhammer (1993) clasificó las bacteriocinas en tres grupos en función de su contenido en residuos Cys: (i) cistibióticos o bacteriocinas con uno o más puentes disulfuro (*e.g.*, PedPA-1/pediocina AcH [PedAcH] y enterocina P [EntP]); (ii) tiolbióticos o bacteriocinas con un único residuo de Cys (*e.g.*, lactococina B [LcnB]), y (iii) bacteriocinas que carecen de residuos Cys (*e.g.*, lactococina A [LcnA], lactococina M [LcnM] y LcnG).

Con respecto al tamaño molecular, los lantibióticos son péptidos pequeños que contienen 19–37 aminoácidos (1,9–4,6 kDa), las bacteriocinas de la clase II poseen 37–59 residuos aminoacídicos y una masa molecular inferior a 10 kDa y, por último, las bacteriocinas de la clase III presentan un tamaño molecular considerablemente superior (>30 kDa) (Cintas *et al.*, 2000b). La mayoría de las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (clases I y II) son catiónicas a pH 7,0 (Jack *et al.*, 1995), poseen un elevado punto isoeléctrico y contienen regiones hidrofóbicas y/o hidrofílicas en sus moléculas, lo que se correlaciona con su actividad sobre la membrana citoplasmática ya que: (i) su elevado pI les permite unirse a los fosfolípidos de carga neta negativa presentes en la membrana de las células sensibles, y, por otra parte, (ii) su naturaleza anfipática les permite su distribución a lo largo de la membrana (Nes *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1999; Diep y Nes, 2002; Nissen-Meyer *et al.*, 2009). Además, estas bacteriocinas son generalmente activas a pH ácido y neutro, lo que podría reflejar su adaptación a las condiciones ambientales en las que se desarrollan los microorganismos productores (Piard y Desmazeaud, 1991; Cintas, 1995). En general, estas bacteriocinas resisten la exposición a un amplio intervalo de valores de pH (3,0–9,0) (Cintas, 1995), habiéndose descrito la tolerancia a valores más extremos (entre 1,0–2,0 y 10,0–11,0) de la acidocina B (Ten Brink *et al.*, 1994) y la bavaricina A (BavA) (Larsen y Nørrung, 1993). Por el contrario, existen bacteriocinas que presentan un intervalo de pH óptimo para su actividad muy estrecho, así, por ejemplo, la solubilidad de NisA disminuye considerablemente en el intervalo de pH 2,0–6,0 y se inactiva irreversiblemente a pH 7,0 (Hurst, 1981).

Otra característica común de las bacteriocinas de las bacterias lácticas es su termoestabilidad, que depende de diversos factores como, entre otros, su grado de pureza y el pH (Cintas *et al.*, 2001). En este contexto, las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes libres de células (bacteriocinas no purificadas) resisten el calentamiento a 100–121 °C y el autoclavado, a excepción de las bacteriocinas de la clase III (*e.g.*, helveticina J) y de la bacteriocina de la clase II enterocina O1 (Olasupo *et al.*, 1994). No obstante, la estabilidad térmica de las bacteriocinas parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad disminuye considerablemente (Cintas *et al.*, 2001).

II.2.2.3. ESPECTRO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA

En general, las bacteriocinas de las bacterias lácticas son activas únicamente frente a otras bacterias Gram-positivas. No obstante, la amplitud del espectro de especies y cepas inhibidas depende de cada bacteriocina y del estado de las células diana, pudiendo fluctuar entre un espectro muy reducido y un espectro relativamente amplio. En este sentido, Jack *et al.* (1995) clasificaron las bacteriocinas en tres grupos: (i) bacteriocinas con espectro de acción reducido, únicamente activas frente a cepas de la misma especie que la del microorganismo productor (*e.g.*, LcnA) o a otras especies de su mismo género (*e.g.*, amilovorina L471); (ii) bacteriocinas con espectro de acción intermedio, que inhiben, además, a otros géneros de bacterias lácticas distintos al del microorganismo productor y a otras bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. y/o *Clostridium* spp. (*e.g.*, Ltn481 y plantaricinas S [PltS] y T [PltT]), y (iii) bacteriocinas con un amplio espectro de acción, activas frente a un gran número de bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen, además de las mencionadas anteriormente, especies de los géneros *Bacillus*, *Brochothrix* y/o *Propionibacterium*. Dentro de este último grupo se encuentran EntL50 (EntL50A y EntL50B), leucocina S (LeuS), PedPA-1, NisA y NisZ, que inhiben también la germinación de los esporos de *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. Por otra parte, conviene destacar que existe una fuerte correlación positiva entre la amplitud del espectro de acción antimicrobiana y la presencia de un enlace disulfuro extra en las bacteriocinas de la clase IIa (Eijsink *et al.*, 1998; Nes y Holo, 2000; Richard *et al.*, 2006; Rihakova *et al.*, 2009).

Asimismo, pueden realizarse las siguientes observaciones con respecto a la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de las clases I y II (Jack *et al.*, 1995): (i) dentro de una misma especie pueden existir cepas sensibles y resistentes a una bacteriocina determinada; (ii) dentro de una población de células sensibles a una bacteriocina pueden existir células resistentes; (iii) una cepa sensible a una bacteriocina puede ser resistente a otra bacteriocina similar; (iv) las cepas productoras de bacteriocina(s) pueden ser sensibles a otras bacteriocinas, incluso similares a la que producen; (v) las células vegetativas de una cepa cuyos esporos bacterianos sean resistentes a una bacteriocina pueden ser sensibles a esa misma bacteriocina, y (vi) generalmente, las bacteriocinas de las bacterias lácticas no son activas frente a las bacterias Gram-negativas porque su membrana externa impide el acceso de estas sustancias a su lugar de acción (membrana citoplasmática). No obstante, se han descrito algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-negativas, de entre las cuales EntAS48 (Gálvez *et al.*, 1989) es la mejor caracterizada hasta el momento (Jennes *et al.*, 2000; Kang y Lee, 2005; Todorov y Dicks, 2005; Yoon *et al.*, 2005; De Kwaadsteniet *et al.*, 2006; Martín-Platero *et al.*, 2006; Line *et al.*, 2008; Svetoch *et al.*, 2008, 2011; Messaoudi *et al.*, 2012; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2012). Asimismo, las bacterias Gram-negativas pueden sensibilizarse a la acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas mediante tratamientos subletales como la exposición a diversos agentes químicos (*e.g.*, ácidos

orgánicos y EDTA) y condiciones ambientales estresantes (*e.g.*, pH, congelación, tratamiento térmico suave y presión hidrostática elevada) (Helander *et al.*, 1997; Kalchayanand *et al.*, 1998; Garriga *et al.*, 2000; De Vuyst y Leroy, 2007).

II.2.2.4. MECANISMO DE ACCIÓN

Las bacteriocinas pueden ejercer un efecto bactericida (provocando la muerte celular) o bacteriostático (inhibiendo el crecimiento celular) sobre las células sensibles, lo que depende de diversos factores tales como la dosis y el grado de purificación de la bacteriocina, el estado fisiológico de las células sensibles (fase de crecimiento) y las condiciones experimentales del ensayo (*e.g.*, temperatura, pH y presencia de compuestos antimicrobianos y de otros agentes que alteren la integridad de la pared celular) (Cintas *et al.*, 2001; Drider *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2009; Jacquet *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012). La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas descritas hasta la fecha se caracterizan por su efecto bactericida frente a los microorganismos sensibles, si bien algunas de ellas (*e.g.*, lactocina 27, leucocina A-UAL187 y LeuS) ejercen un efecto bacteriostático.

De forma general, la acción antimicrobiana de las bacteriocinas (clases Ia y II) se debe a la desestabilización funcional de las membranas citoplasmáticas de las células sensibles. Este proceso se desarrolla en tres etapas básicas: (i) unión de la bacteriocina a la membrana; (ii) inserción en la misma y (iii) formación de poros (Abee, 1995; Hauge *et al.*, 1998; Montville y Chen, 1998; Moll *et al.*, 1999; Lee y Kim, 2011; Nishie *et al.*, 2012). Con respecto a la primera de estas etapas, aunque tradicionalmente se había hipotetizado que la unión de las bacteriocinas a las membranas citoplasmáticas está gobernada por interacciones electrostáticas entre sus residuos cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de las membranas bacterianas, recientemente se están produciendo numerosos avances en la identificación de receptores específicos localizados en las membranas de las células sensibles requeridos para que las bacteriocinas ejerzan su acción antimicrobiana (Cotter, 2014) (Fig. 2.3). En este sentido, se conoce que algunos lantibióticos, así como la lactococcina 972 (Lcn972), interaccionan con el lípido II, un precursor de la síntesis del peptidoglicano unido a la membrana citoplasmática que actúa como molécula *docking*, es decir, facilitando la interacción de las bacteriocinas con las membranas de las células sensibles y la posterior formación de poros en las mismas y, por otra parte, como diana de estos péptidos, provocando la inhibición de la síntesis de la pared celular (Martin y Breukink, 2007; Martínez *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2012; Munch *et al.*, 2014). De manera similar, se ha sugerido que una de las subunidades del sistema fosfotransferasa (PTS, del inglés *PhosphoTransferase System*) manosa-específico (EII_t^{Man}) puede actuar como receptor de las bacteriocinas de la subclase IIa, así como de otras bacteriocinas pertenecientes a la clase II, entre las que se incluyen LcnA y LcnB (Diep *et al.*, 2007; Kjos *et al.*, 2011a). Más recientemente, se han descrito un transportador ABC de maltosa, una metalopeptidasa dependiente de Zn y una undecaprenil-pirofosfato fosfatasa (UppP) como receptores para las bacteriocinas GarML, LsbB y LcnG/enterocina 1071(Ent1071)/lactococina Q (LcnQ),

respectivamente (Gabrielsen *et al.*, 2012; Uzelac *et al.*, 2013; Kjos *et al.*, 2014). Sin embargo, contrariamente a estos resultados, conviene destacar que el empleo de bicapas lipídicas modelo (liposomas) ha permitido demostrar la actividad formadora de poros de Ped PA-1 y EntP en ausencia de receptores proteicos o componentes específicos de la superficie bacteriana (Chen *et al.*, 1997; Herranz *et al.*, 2001). En cualquier caso, la identificación de nuevos receptores de bacteriocinas puede contribuir a una mejor comprensión de su mecanismo de acción y, con ello, a generar un mayor interés para su aplicación comercial por la industria farmacéutica. El hecho de que los receptores descritos hasta el momento difieran de las dianas descritas para los antibióticos sugiere que no es probable que se desarrollen resistencias cruzadas a ambos antimicrobianos y apoya la posibilidad de usarlos de manera combinada como herramienta para un mejor control de los patógenos (Cotter, 2014).

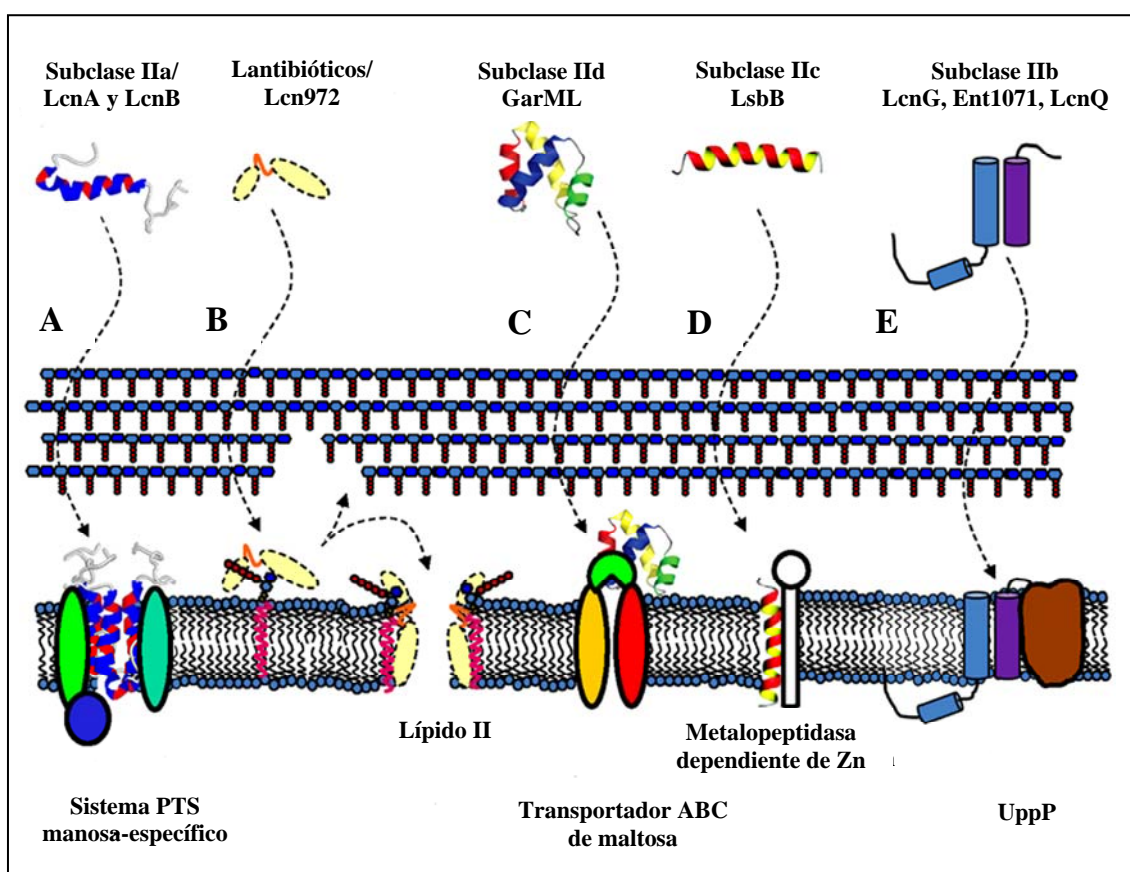


Figura 2.3. Receptores implicados en el mecanismo de acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas. A: Componentes del sistema PTS manosa-específico; B: Lípido II; C: Transportador ABC de maltosa; D: Metalopeptidasa dependiente de Zn; E: Undecaprenil-pirofosfato fosfatasa (UppP). *Adaptado de Cotter (2014).*

En lo que respecta a la segunda etapa del mecanismo general de acción de las bacteriocinas, su inserción en la membrana plasmática, se han propuesto dos modelos principales por los que esta tendría lugar (Abee, 1995; Moll *et al.*, 1999) (Fig. 2.4): (i) el modelo de “cuña”, aplicable a NisA y otros lantibióticos, según el cual las moléculas de bacteriocina se sitúan de forma

paralela a la membrana, agregan y, posteriormente, se insertan en la membrana, formando un poro en el que también participan los lípidos de la membrana y (ii) el modelo de “duela de barril”, aplicable a diversas bacteriocinas de la clase II, según el cual las bacteriocinas se integran en la membrana como monómeros, agregando posteriormente para establecer estructuras con forma de barril en las que las caras hidrofílicas se dirigen hacia la luz del poro y las hidrofóbicas interaccionan con el núcleo hidrofóbico de la membrana. Finalmente, la formación de poros en la membrana posibilita el flujo pasivo de pequeñas moléculas (iones, aminoácidos y ATP), lo que conduce a la disipación de uno o ambos componentes de la fuerza protón-motriz (PMF, del inglés *Proton Motive Force*, un gradiente electroquímico transmembrana necesario para el desarrollo de los procesos metabólicos dependientes de energía): el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y/o el gradiente de pH (ΔpH) (Montville y Bruno, 1994; Moll *et al.*, 1999; Drider *et al.*, 2006). La alteración o colapso de la PMF provoca una reducción significativa del contenido de ATP intracelular, que se hidroliza en un intento vano de reestablecer los gradientes iónicos disipados, por lo que se impide el transporte activo de nutrientes y el mantenimiento de concentraciones adecuadas de ciertos iones (H^+ , Na^+ , K^+ y Mg^{2+}) y se reduce la síntesis de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), lo que conduce al cese del crecimiento bacteriano y, en última instancia, origina la muerte celular (Moll *et al.*, 1999; Herranz, 2001). Adicionalmente, en algunos casos, la actividad bactericida de las bacteriocinas puede ir acompañada de la lisis de las células sensibles (bacteriocinas bactericidas bacteriolíticas) (*e.g.*, NisA, plantaricina C y enterococcina EFS2) debida a la entrada masiva de agua y el consiguiente choque osmótico (Ojcius y Young, 1991) o a la activación de enzimas autolíticas asociadas a la pared celular bacteriana (Jack *et al.*, 1995; Martínez-Cuesta *et al.*, 2000).

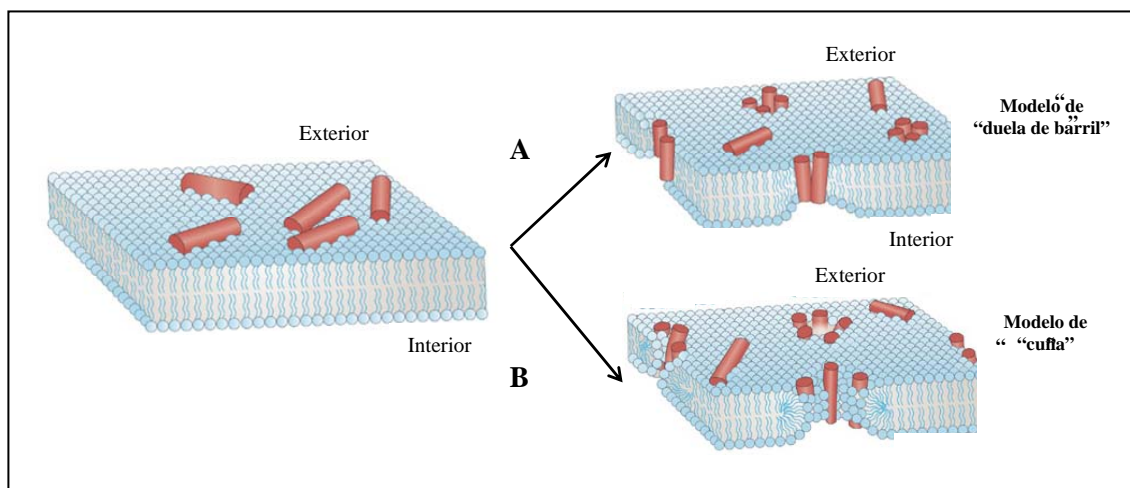


Figura 2.4. Principales modelos propuestos para la formación de poros por las bacteriocinas en las membranas de las bacterias sensibles. A: Modelo de “duela de barril” (del inglés *barrel stave*): los péptidos se insertan perpendicularmente a la membrana y se asocian, formando un poro en el que los péptidos se alinean paralelamente a las cadenas de fosfolípidos; B: Modelo de “cuña” (del inglés *wedge*): los péptidos se insertan perpendicularmente a la membrana e inducen una curvatura local de las cadenas de fosfolípidos, de manera que la luz del poro resultante está constituida tanto por péptidos como por cabezas de fosfolípidos. *Adaptado de Melo et al. (2009).*

Finalmente, conviene destacar que algunas bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas ejercen su actividad antimicrobiana mediante mecanismos diferentes a la inhibición de la síntesis de la pared celular (Fig. 2.5B), la formación de poros en la membrana plasmática (Fig. 2.5A y C) o ambos mecanismos (*e.g.* NisA, Fig. 2.5), como: (i) la inhibición de la actividad de la enzima fosfolipasa A2, por algunos lantibióticos globulares (clase Ib) (*e.g.*, ancovenina, cinamicina, duramicina) y (ii) la hidrólisis de la pared celular por las bacteriocinas de la clase III (*e.g.*, EnlA, Fig. 2.5D), lo que provoca la lisis de las células sensibles (Nilsen *et al.*, 2003).

II.2.2.5. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS

Los determinantes genéticos asociados a la síntesis de las bacteriocinas forman agrupaciones génicas (*clusters*) compuestas por varios genes agrupados en uno, dos o, incluso,

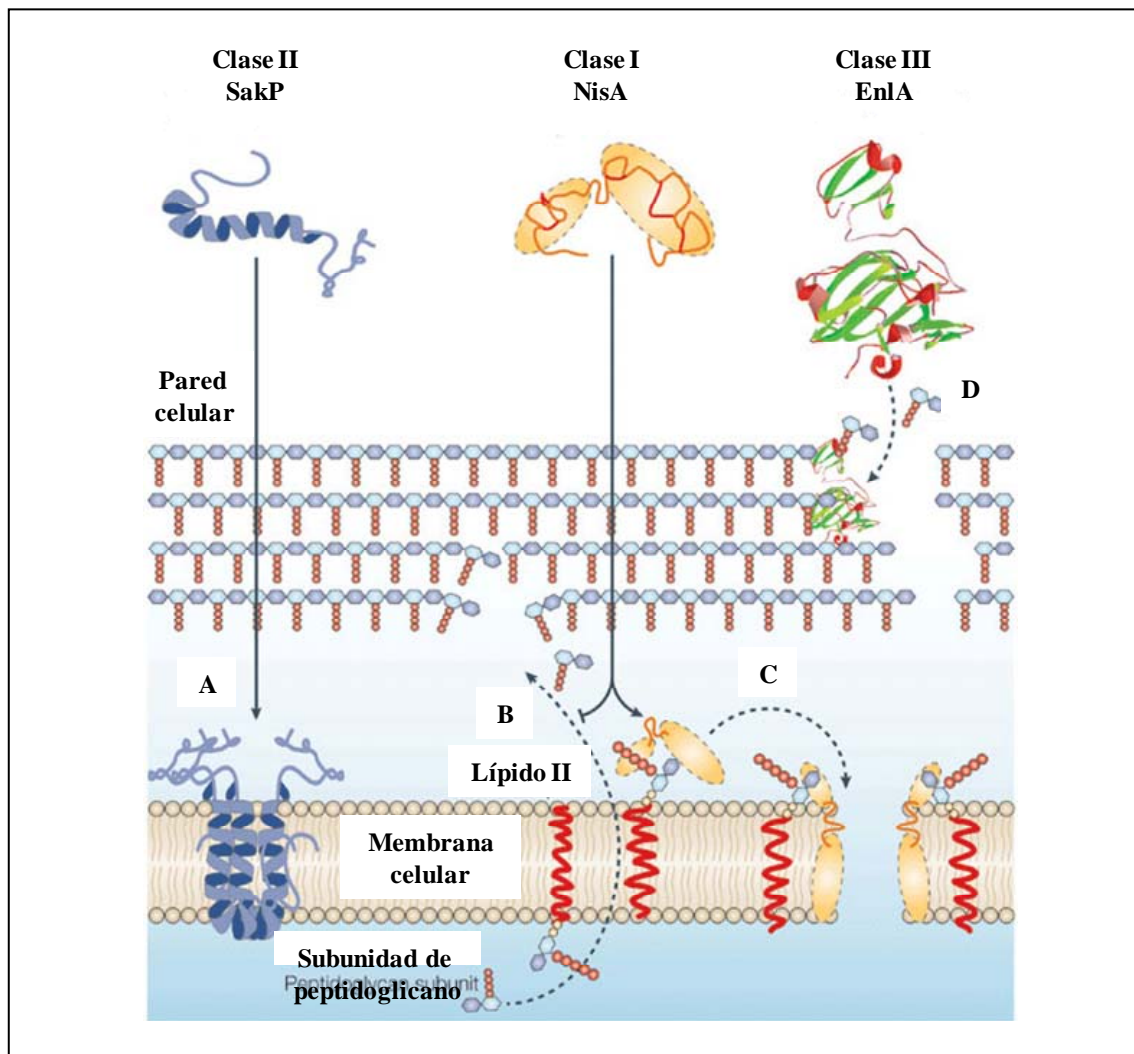


Figura 2.5. Principales mecanismos de acción propuestos para las bacteriocinas de las bacterias lácticas. A: formación de poros en la membrana mediada por una molécula *docking*; B: inhibición de la síntesis de la pared celular; C: formación de poros en la membrana no mediada por una molécula *docking*; D: Hidrólisis de la pared celular. Adaptado de Cotter et al. (2005b).

tres operones. Estas agrupaciones génicas (Fig. 2.6) constan generalmente de los genes que codifican: (i) la preprobacteriocina (gen estructural); (ii) la proteína de inmunidad que protege a la célula productora de la toxicidad de la bacteriocina; (iii) las proteínas responsables del procesamiento y transporte de la preprobacteriocina, que en el caso de transportadores del tipo ABC (sección II.2.2.5.3.1) requieren otro gen que codifica una proteína accesoria esencial para la función de estos transportadores y, en algunos casos; (iv) enzimas responsables de las modificaciones postraduccionales de la probacteriocina, y (v) componentes involucrados en la regulación de la biosíntesis de la preprobacteriocina (Nes *et al.*, 1996; Sablon *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Pag y Sahl, 2002a, b; Chen y Hoover, 2003; Skaugen *et al.*, 2003; Nes *et al.*, 2012).

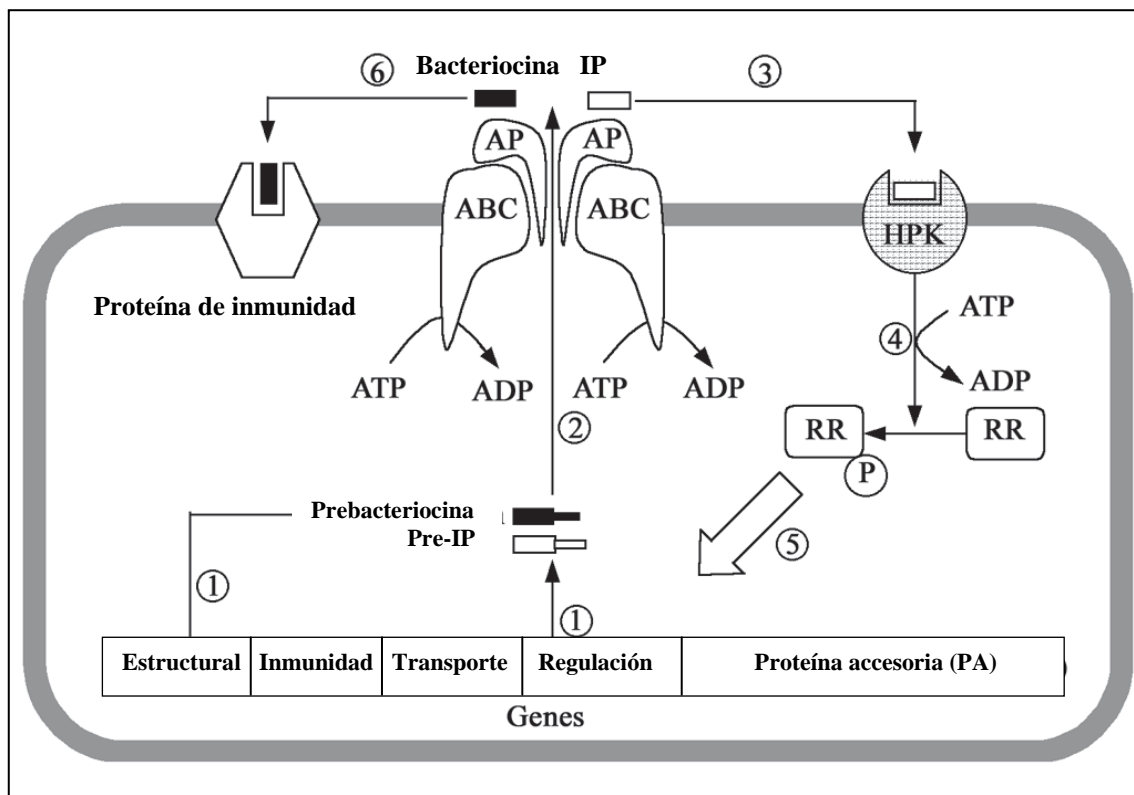


Figura 2.6. Representación esquemática de las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de bacteriocinas de la clase II. 1: transcripción de los genes de la preprobacteriocina y de otros genes asociados; 2: transporte y procesamiento de la preprobacteriocina y del IP a través de un transportador ABC; 3: interacción del IP con la HPK e inducción de la fosforilación de esta a expensas del ATP; 4: transferencia del fosfato desde HPK a RR; 5: activación del promotor de la transcripción regulado por acción del RR fosforilado; 6: interacción de la bacteriocina con la proteína de inmunidad. ABC, transportador del tipo ABC; AP, proteína accesoria del transportador del tipo ABC; HPK, proteína histidín-quinasa; IP, péptido inductor; RR, proteína reguladora de respuesta. *Adaptado de Chen y Hoover (2003).*

En lo que respecta a su localización, las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de las bacteriocinas pueden localizarse en plásmidos, en el cromosoma o, incluso, en transposones. En este contexto, en cepas productoras de múltiples bacteriocinas, los genes implicados en su

síntesis pueden localizarse: (i) en un único plásmido, como es el caso de LcnA, LcnB y LcnM de *L. lactis* subesp. *cremoris* 9B4, codificadas en el plásmido p9B4-6 (Van Belkum *et al.*, 1992) y las salivaricinas A2 y B de *S. salivarius* K12, codificadas en un megaplásmido de 190 kb (Hyink *et al.*, 2007); (ii) en el cromosoma, como es el caso de las plantaricinas N (PltN), EF (PltEF) y JK (PltJK) producidas por *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002) y la bovicina HJ50 (Liu *et al.*, 2009), o (iii) en el cromosoma y en plásmidos diferentes, como es el caso de EntL50 (EntL50A y EntL50B), EntP y EntQ producidas por *E. faecium* L50, codificadas en los plásmidos pCIZ1 (50 kb aprox.), pCIZ2 (7,4 kb) y en el cromosoma, respectivamente (Cintas *et al.*, 1998a; Criado *et al.*, 2006); y carnobacteriocinas BM1 (CbnBM1), B2 (CbnB2) y CbnA producidas por *Carnobacterium piscicola* LV17, codificadas en el cromosoma y en los plásmidos pCP49 (72 kb) y pCP40 (61 kb), respectivamente (Quadri *et al.*, 1994; Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995, 1997b). Por otra parte, conviene destacar que la localización de los genes que codifican una bacteriocina puede variar según la cepa productora, como se ha descrito en el caso de algunas bacteriocinas (sakacina P [SakP], EntL50 [EntL50A y EntL50B] y EntAS-48) (Moreno *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2005; Cocolin y Rantsiou, 2007).

II.2.2.5.1. Gen(es) estructural(es)

La mayoría de los genes estructurales de las bacteriocinas de las bacterias lácticas codifican precursores biológicamente inactivos (preprobacteriocinas) que contienen una extensión N-terminal y un propéptido C-terminal (probacteriocina), que, tras su procesamiento, dará lugar a la bacteriocina madura. Las extensiones N-terminales pueden ser: (i) secuencias líder del tipo “doble glicina” (Gly-Gly) (15–30 aa), reconocidas por los sistemas de transporte del tipo ABC (sección II.2.2.5.3.1) (Håvarstein *et al.*, 1994, 1995; Franke, 1998); (ii) secuencias líder del tipo FNLDV o tipo nisina (23–30 aa), reconocidas también por los sistemas de transporte del tipo ABC (sección II.2.2.5.3.1) (Nes y Johnsborg, 2004; De Jong *et al.*, 2006), o (iii) péptidos señales (SP, del inglés *Signal Peptide*) (18–30 aa), que permiten el procesado y la secreción de bacteriocinas por el sistema Sec (sección II.2.2.5.3.2). De forma general, estas extensiones desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento, procesamiento y la secreción al medio extracelular de las bacteriocinas. Asimismo, se ha sugerido que las extensiones N-terminales: (i) podrían intervenir en la modificación postraducciona de ciertos lantibióticos (Skaugen *et al.*, 2003) y (ii) mantienen a las bacteriocinas biológicamente inactivas en el interior de la célula productora, protegiéndola de sus efectos tóxicos mientras permanecen en su interior (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996), si bien se ha descrito que el precursor de PedAcH/PedPA-1 posee actividad antimicrobiana (Ray *et al.*, 1999). No obstante, conviene destacar que, también existen algunas bacteriocinas que se sintetizan sin ningún tipo de extensión N-terminal, como es el caso de EntL50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a), EntQ (Cintas *et al.*, 2000d), enterocina EJ97 (EntEJ97) (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003), enterocina MR10 (EntMR10 [EntMR10A y EntMR10B]) (Martín-Platero *et al.*, 2006), bacteriocina LsbB (Gajic *et al.*, 2003), aureocina

A70 (AurA70 [AurA, AurB, AurC y AurD]) (Netz *et al.*, 2001) y aureocina A53 (Netz *et al.*, 2002), habiéndose demostrado en el caso de las bacteriocinas LsbB, EntEJ97 y EntQ que en su secreción intervienen transportadores ABC (Gajic *et al.*, 2003; Criado, 2006). Por otra parte, las bacteriocinas pertenecientes a la subclase IIb (sistema de dos péptidos) (*e.g.*, EntL50 [EntL50A y EntL50B] y sakacina T [SakT (SakTa y SakT β)]) contienen dos genes estructurales contiguos.

II.2.2.5.2. Gen(es) de inmunidad

En la mayoría de los casos, el gen que codifica la proteína de inmunidad se localiza en el mismo operón que el gen estructural, de forma contigua y con idéntica orientación, de manera que se expresa concomitantemente con la bacteriocina (Nes *et al.*, 1996). No obstante, en ocasiones, los genes de inmunidad tienen una localización atípica, como ocurre en las agrupaciones génicas de las bacteriocinas: (i) LsbB de *L. lactis* BGM1 (Gajic *et al.*, 2003), EntB de *E. faecium* BFE 900 (Franz *et al.*, 1999) y CbnA de *C. piscicola* LV17A (Franz *et al.*, 2000), en las que se encuentran situados próximos al gen estructural pero con orientación contraria, y (ii) la munditocina KS de *Enterococcus mundtii* NFRI 7393 (Kawamoto *et al.*, 2002), en la que los genes estructural, de transporte y de inmunidad, contiguos y con la misma orientación, se encuentran situados en un único operón, si bien el gen de transporte se encuentra situado entre el gen estructural y el de inmunidad.

De forma general, las proteínas de inmunidad se caracterizan por su pequeño tamaño molecular (51–154 aa) y su elevado pI (7–10), así como por la presencia de posibles segmentos hidrofóbicos transmembrana, lo que sugiere que podrían integrarse en las membranas citoplasmáticas de las células productoras para ejercer su acción protectora (Fremaux *et al.*, 1993; Diep *et al.*, 1996, 2007; Nes *et al.*, 2012). A este respecto, Venema *et al.* (1994) sugirieron que LciA, proteína de inmunidad de la LcnA, podría interaccionar a través de su segmento transmembrana con una proteína transmembrana que funcionara como receptor de la bacteriocina, lo que dificultaría su inserción en la membrana y, por lo tanto, su acción antimicrobiana. Posteriormente, otros autores también sugirieron que las proteínas de inmunidad actuarían alterando la interacción entre la bacteriocina y su hipotético receptor localizado en la membrana (Quadri *et al.*, 1995; Sprules *et al.*, 2004). Por otra parte, Abee (1995) sugirió que las proteínas de inmunidad podrían interaccionar con las bacteriocinas en el medio extracelular para impedir su interacción con las membranas y la consiguiente formación de poros. No obstante, esta hipótesis se descartó tras demostrarse que: (i) las proteínas de inmunidad de LcnA y CbnB2 no son activas desde el exterior celular (Venema *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995) y (ii) la localización de la proteína de inmunidad de la mesentericina Y105 (MesY105) es intracelular (Johnsen *et al.*, 2004). El modelo propuesto por Abee (1995) también sugería que la proteína de inmunidad podría interaccionar con las moléculas de bacteriocina integrantes de los poros de membrana, desestabilizándolos y/o sellándolos. No obstante, resulta poco probable que exista una interacción directa entre la bacteriocina y su proteína de inmunidad, ya que la homología entre las proteínas de inmunidad de bacteriocinas

estrechamente relacionadas es escasa (Nes *et al.*, 1996; Fimland *et al.*, 2002; Nes *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado a este respecto que la estructura tridimensional de las proteínas de inmunidad de CbnB2 y EntA es muy similar a pesar de conferir resistencia a bacteriocinas con secuencias aminoacídicas muy diferentes (Sprules *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005b; Drider *et al.*, 2006).

Otros estudios más recientes encaminados a elucidar el mecanismo molecular de acción de las proteínas de inmunidad han mostrado que la mitad C-terminal de las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa contiene una región implicada en el reconocimiento específico, directo o indirecto, del extremo C-terminal de las bacteriocinas frente a las que confieren inmunidad; asimismo, estos estudios han puesto de manifiesto que las proteínas de inmunidad no interactúan estrechamente con la membrana citoplasmática, sino que pueden estar asociadas a ella débilmente como proteínas de membrana periféricas, lo que permitiría su interacción con las bacteriocinas. Así, de acuerdo con este modelo, la bacteriocina y la proteína de inmunidad se situarían en lados opuestos de la membrana celular, por lo que no existiría contacto directo entre ambas moléculas (Johnsen *et al.*, 2004; Fimland *et al.*, 2005; Johnsen *et al.*, 2005a; Drider *et al.*, 2006).

Adicionalmente, algunos transportadores del tipo ABC (sección II.2.2.5.3.1) están implicados en la inmunidad frente a bacteriocinas mediante la eliminación activa de las moléculas que consigan penetrar en la membrana desde el medio extracelular, lo que evita su acumulación en la membrana (Young y Holland, 1999; Stein *et al.*, 2005). Este mecanismo se ha descrito en la mayoría de los lantibióticos, y puede constituir el único mecanismo de inmunidad presente, tal es el caso de Ltn481 (Rincé *et al.*, 1997) o un mecanismo adicional, como ocurre en el caso de NisA (Siezen *et al.*, 1996) y la subtilina (Klein y Entian, 1994). Por consiguiente, en estos sistemas existen dos transportadores del tipo ABC, uno implicado en la secreción del precursor del lantibiótico y otro en la inmunidad frente a su forma madura. A este respecto, conviene destacar que no existen homologías entre ambos transportadores y que, además, su configuración es diferente, ya que en el transportador implicado en la secreción, sus dos dominios forman parte de un único polipéptido, mientras que en el implicado en la inmunidad cada dominio se sintetiza de manera independiente (Young y Holland, 1999). Por otra parte, también se han descrito transportadores del tipo ABC implicados en la inmunidad frente a algunas bacteriocinas de la clase II, como en el caso de EntAS-48 (Díaz *et al.*, 2003), CirA (Kemperman *et al.*, 2003) y las bacteriocinas LsbA y LsbB (Gajic *et al.*, 2003). Es interesante destacar el caso especial de estas últimas, en el que LmrB es un transportador MDR (del inglés, *Multidrug Resistance*) del tipo ABC con función dual, responsable tanto del transporte como de la inmunidad frente a LsbA (sintetizada con secuencia líder) y LsbB (sintetizada sin extensión N-terminal) (Gajic *et al.*, 2003). De forma similar, es probable que los transportadores ABC EntL50GHJ y EntQB de *E. faecium* L50 ejerzan una función dual, estando implicados tanto en la secreción de EntL50 (EntL50A y EntL50B) y EntQ, respectivamente, como en la inmunidad frente a estas bacteriocinas (Criado, 2006).

II.2.2.5.3. Genes de transporte y procesamiento

En todas las células, las proteínas extracitoplasmáticas deben transportarse a través de una o varias bicapas lipídicas hasta alcanzar su destino final. En la mayoría de los casos, estas proteínas se sintetizan en forma de precursores inactivos con una extensión N-terminal del tipo SP que actúa como lugar de reconocimiento para su transporte, procesamiento y secreción por la Ruta General de Secreción (GSP, del inglés *General Secretary Pathway*) o sistema Sec (Van Wely *et al.*, 2001; Natale *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas proteínas y otros compuestos de diversa naturaleza pueden secretarse mediante sistemas específicos como: (i) el sistema de transporte del tipo ABC, también denominado sistema de secreción tipo I o sistema de transporte dedicado (DTS, del inglés *Dedicated Transport System*); (ii) el sistema de secreción dependiente de contacto o de tipo III, también conocido como “inyectisoma” (Plano *et al.*, 2001); (iii) el sistema de tipo IV de translocación de proteínas y ADN, también dependiente de contacto (Christie, 2001); (iv) el sistema de autotransporte o tipo V (Desvaux *et al.*, 2004), y, por último, (v) el sistema de transporte tipo VI, implicado en la virulencia de ciertos patógenos Gram-negativos (Pukatzki *et al.*, 2006).

En lo que se refiere a las bacteriocinas de las bacterias lácticas, la mayoría de estos péptidos se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder doble glicina y se secretan por la acción de un transportador del tipo ABC y su proteína accesoria, cuyos genes se encuentran generalmente ligados al gen estructural y al de inmunidad (Nes *et al.*, 1996). No obstante, dentro de la clase II, también existen algunas bacteriocinas que se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo SP que permite su reconocimiento y secreción a través del sistema Sec en ausencia de transportadores específicos. A continuación, se describen las características más relevantes de ambos sistemas así como su implicación en la secreción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas.

II.2.2.5.3.1. Sistema de transporte del tipo ABC o sistema de transporte dedicado

Los sistemas de transporte del tipo ABC, presentes en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se encargan tanto de la internalización como de la secreción de muchas sustancias (*e.g.*, antibióticos, aminoácidos, péptidos y proteínas, azúcares y bacteriocinas), además de intervenir en numerosos procesos celulares y su regulación (Fath y Kolter, 1993; Dassa y Bouige, 2001; Lorca *et al.*, 2010). Estos transportadores constituyen una de las familias de proteínas más numerosas y, de hecho, se ha demostrado que casi el 5% del genoma de *Ec. coli* está constituido por genes que codifican componentes de este sistema de transporte (Higgins, 2001; Lorca *et al.*, 2010).

Los sistemas de transporte del tipo ABC están compuestos por un miembro de la familia de los transportadores del tipo ABC, una proteína accesoria de membrana y, en las bacterias Gram-negativas, una proteína de la membrana externa (Fig. 2.7). Los genes que codifican el transportador del tipo ABC y la proteína accesoria suelen ser contiguos, mientras que el que

codifica la proteína de la membrana externa puede localizarse a continuación o independientemente de los dos anteriores (Håvarstein *et al.*, 1995; Franke, 1998). Asimismo, los transportadores del tipo ABC clásicos son homodímeros que constan de cuatro dominios: dos dominios transmembrana (TMD, del inglés *Transmembrane Domain*), situados en la región N-terminal, y dos dominios de unión al ATP, localizados en el extremo C-terminal (Higgins, 2001). Los TMD son hidrófobos y, generalmente, contienen seis segmentos transmembrana (TMS, del inglés *Transmembrane Segment*) mientras que los dominios de unión al ATP son hidrófilos y se encuentran situados en el lado citoplasmático de la membrana, donde también se sitúa el extremo N-terminal (Fig. 2.7) (Håvarstein *et al.*, 1995; Wandersman, 1998; Lorca *et al.*, 2010). Por otra parte, la proteína accesoria posee una región N-terminal localizada en el citoplasma (aprox., 20 aa), un dominio central integral transmembrana y una región C-terminal orientada hacia el lado extracelular de la membrana citoplasmática que conecta con el extremo N-terminal mediante un TMS (Franke, 1998). La función exacta de las proteínas accesorias aún no se ha determinado con exactitud; no obstante, se conoce que en las bacterias Gram-positivas resultan imprescindibles para la secreción de algunas bacteriocinas (Skaugen *et al.*, 2003), mientras que en las Gram-negativas serían las encargadas de conectar la membrana interna con la externa, por lo que se denominan “proteínas de fusión de membrana” (Franke, 1998; Gajic, 2003). Adicionalmente, en las bacterias Gram-negativas, las proteínas o sustancias liberadas al espacio periplásmico por este sistema de secreción requieren de la presencia de un polipéptido de la membrana externa que permite su paso al exterior mediante la formación de un canal hidrófilo en la misma. En el caso concreto de las bacteriocinas secretadas mediante este sistema, los transportadores son específicos para cada una de estas moléculas y están constituidos por un transportador del tipo ABC y su proteína accesoria, cuyos genes son contiguos, se coexpresan y, además, se encuentran ligados generalmente al gen estructural y al de inmunidad formando un único operón (Nes *et al.*, 1996, 2012). No obstante, CbnBM1 producida por *C. piscicola* LV17 constituye un caso especial, ya que, a pesar de que sus genes estructural y de inmunidad se localizan en el cromosoma, su síntesis depende de la presencia del plásmido pCP40 (61 kb) que codifica un transportador del tipo ABC y que además contiene el gen estructural y de inmunidad de la CbnB2 (Quadri *et al.*, 1994, 1997b; Saucier *et al.*, 1997). Así pues, *C. piscicola* LV17 constituye un ejemplo de cepa productora de múltiples bacteriocinas que comparten el mismo mecanismo de transporte. A este respecto, conviene destacar que en las cepas productoras de múltiples bacteriocinas es común encontrar un único transportador del tipo ABC implicado en el transporte de todas ellas, si bien esto ocurre generalmente cuando sus precursores muestran una elevada homología en sus secuencias líder (Eijsink *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003). Por otra parte, como se ha mencionado, en algunas bacteriocinas carentes de extensión N-terminal, como es el caso de LsbB, EntQ y, probablemente, EntL50A y EntL50B, los transportadores del tipo ABC posiblemente ejerzan una función dual, estando encargados tanto del transporte de estas moléculas como de la inmunidad frente a las mismas (Gajic *et al.*, 2003; Criado *et al.*, 2006).

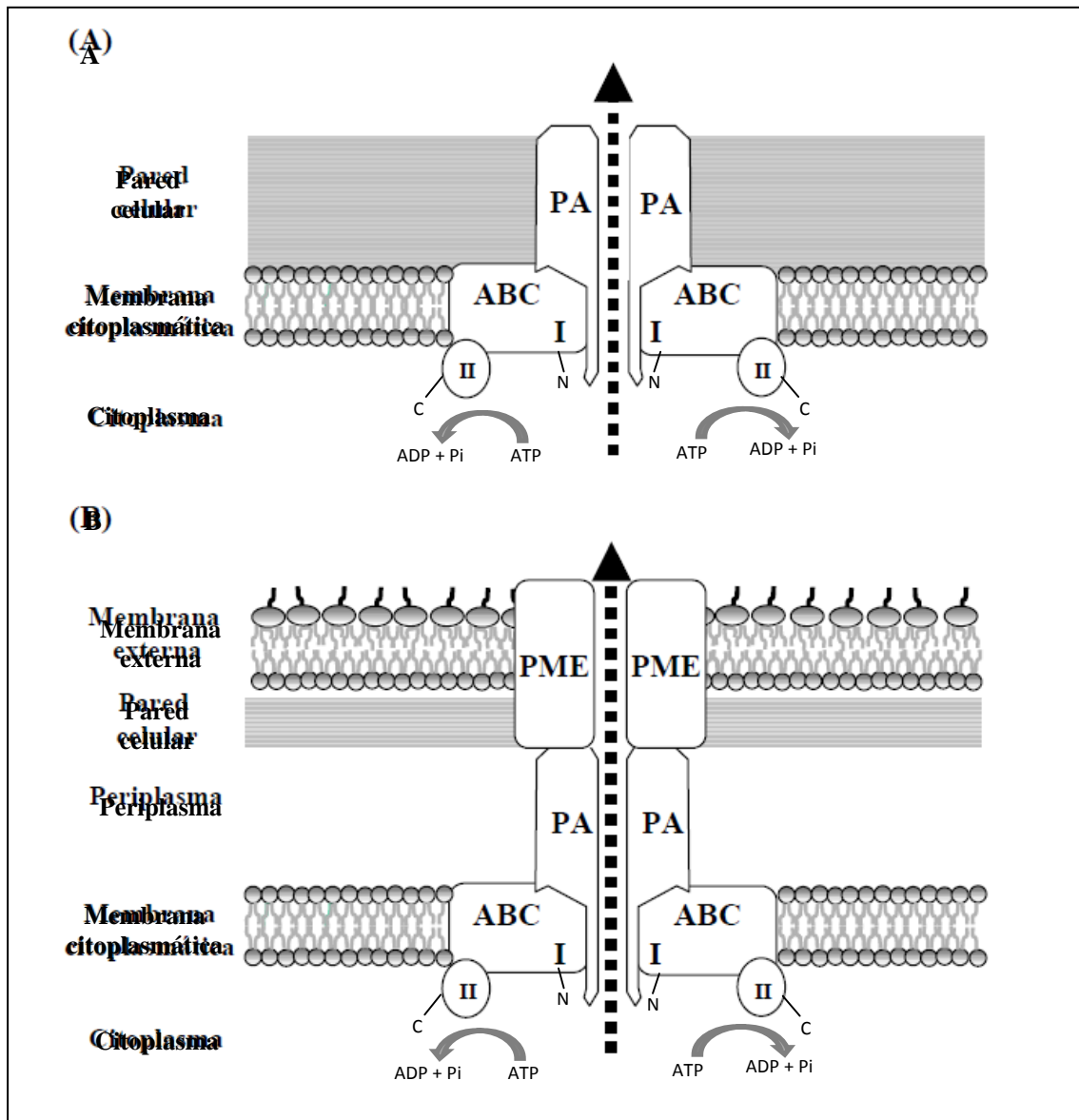


Figura 2.7. Representación esquemática de un sistema de secreción ABC clásico en bacterias Gram-positivas (A) y Gram-negativas (B). La proteína transportadora (ABC) consta de un dominio hidrofóbico N-terminal (I), que en la mayoría de los casos contiene seis TMS, y de un dominio C-terminal (II) que contiene los sitios de unión para el ATP. La proteína accesoria (PA) interacciona con el transportador ABC y, en las bacterias Gram-negativas, con una proteína de la membrana externa (PME), formando un canal de translocación a través de las membranas citoplasmática y, en su caso, externa. *Adaptado de Franke (1998).*

Los transportadores del tipo ABC de bacteriocinas son generalmente homodímeros de aproximadamente 700 aminoácidos, que difieren de los transportadores ABC clásicos por presentar un dominio N-terminal (aprox., 150 aa) adicional con función proteolítica que contiene residuos conservados de Cys e His y que se localiza en la cara interna de la membrana citoplasmática. La función de este dominio consiste en el reconocimiento de la preprobacteriocina y en la posterior hidrólisis de su secuencia líder tras los dos residuos Gly situados en las posiciones -1 y -2 con respecto al punto de corte de su secuencia líder.

Adicionalmente, como se ha mencionado, para la secreción de algunas bacteriocinas es imprescindible la presencia de la proteína accesoria de membrana (Schneider y Hunke, 1998; Young y Holland, 1999; Dassa, 2000; Gajic, 2003). El mecanismo de transporte de los precursores de bacteriocinas que contienen secuencias líder del tipo Gly-Gly fue propuesto por Håvarstein *et al.* (1995). En dicho modelo, cada uno de los dos dominios proteolíticos del homodímero del transportador del tipo ABC, así como los dos dominios C-terminales, unirían sendos precursores (prebacteriocinas) y moléculas de ATP, respectivamente, de manera que la energía liberada por la hidrólisis del ATP induciría un cambio conformacional en el transportador que tendría como resultado el procesamiento y la translocación concomitante de la probacteriocina a través de la membrana.

II.2.2.5.3.2. Sistema Sec o ruta general de secreción

La principal ruta de translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática bacteriana es el sistema Sec o ruta general de secreción (GSP, del inglés *General Secretary Pathway*). Los péptidos o proteínas que utilizan esta ruta se sintetizan como precursores con una extensión N-terminal del tipo SP que asegura su correcta aproximación a la membrana citoplasmática (Pugsley, 1993; Driessen y Nouwen, 2008; Natale *et al.*, 2008), se transportan a través de la misma mediante un complejo proteico denominado translocasa y, finalmente, se procesan por la acción de una peptidasa señal antes de ser liberados al medio extracelular.

Los SP son extensiones N-terminales de 18 a 30 aminoácidos que, aunque no presentan homologías en su secuencia primaria, poseen tres dominios característicos con propiedades físico-químicas comunes (Fekkes y Driessen, 1999; Mori e Ito, 2001; Van Roosmalen *et al.*, 2004):

1. Dominio N. Consta de 1–5 aminoácidos y posee una carga neta positiva que es superior en los SP de las bacterias Gram-positivas. Este dominio interacciona con la proteína SecA y con los fosfolípidos de carga negativa de la membrana citoplasmática, por lo que es importante para la entrada de las preproteínas en la ruta de translocación.
2. Dominio H. Compuesto por 7–15 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica que pueden adoptar una conformación en hélice- α . Frecuentemente, en la mitad de esta región se localiza un residuo de Gly o Pro que rompe la estructura de hélice- α de la zona, favoreciendo que el SP adopte una estructura similar a una horquilla, lo que le permite insertarse en la bicapa lipídica. Este dominio constituye la parte más importante del SP, puesto que su longitud e hidrofobicidad están directamente correlacionadas con la eficacia de la translocación.
3. Dominio C. Integrado por 3–7 aminoácidos y de carácter polar. Constituye la única zona del SP que necesita cierta especificidad en su estructura primaria, puesto que contiene el sitio de corte de la peptidasa señal que procesará el SP.

A continuación se describen los principales componentes de la translocasa bacteriana y el sistema de translocación y procesamiento de los precursores proteicos, los cuales se resumen en la Fig. 2.8. La mayoría de las características y propiedades que se citan hacen referencia a *Ec. coli* puesto que su translocasa es la más estudiada; no obstante se han descrito sistemas homólogos en *Bacillus subtilis*, células eucariotas y arqueas (van Wely *et al.*, 2001; Driessen y Nouwen, 2008; Natale *et al.*, 2008).

II.2.2.5.3.2.1. Componentes integrales de membrana de la translocasa

El núcleo de la translocasa está constituido por un complejo heterotrimérico formado por las proteínas integrales de membrana SecY, SecE y SecG. El complejo SecYEG actúa como un canal conductor facilitando tanto la integración de proteínas en la membrana como su movimiento a través de la misma para ser secretadas. Aunque no es indispensable para la translocación, la asociación de SecYEG con el complejo heterotrimérico SecDFYajC aumenta la eficacia de este proceso (Mori e Ito, 2001; Driessen y Van der Does, 2002; Rusch y Kendall, 2007). Por otra parte, YidC es una proteína esencial en *Ec. coli* que está implicada en la inserción de proteínas de membrana y que puede funcionar tanto de forma independiente como en cooperación con SecYEG-SecDFYajC (Yuan *et al.*, 2010).

II.2.2.5.3.2.2. SecB y partícula reconocedora de señal (SRP)

Los precursores proteicos pueden alcanzar el núcleo de la translocasa: (i) de forma directa guiados por el SP; (ii) dirigidos por SecB, una chaperona molecular citosólica presente únicamente en bacterias Gram-negativas, y (iii) mediante la ruta de la partícula reconocedora de señal (SRP, del inglés *Signal Recognition Particle*). En *Ec. coli* esta última ruta se emplea fundamentalmente para el transporte de proteínas que se insertan en la membrana (Driessen y Van der Does, 2002). En lo que respecta a las bacterias Gram-positivas, estudios de proteómica recientes han puesto de manifiesto que en *B. subtilis* la ruta SRP, además de participar en la integración de proteínas de membrana, se encarga de dirigir hacia el núcleo de la translocasa una gran proporción de las proteínas secretadas por este microorganismo. Esta observación sugiere la existencia de determinantes de especificidad no identificados hasta la fecha en los SP de estas proteínas que serían responsables de su dependencia de la ruta dependiente de SRP (Yuan *et al.*, 2010).

II.2.2.5.3.2.3. SecA y mecanismo de translocación proteica

SecA es una proteína con actividad ATPasa que se halla unida periféricamente al complejo SecYEG y que desempeña un papel fundamental en el mecanismo de translocación proteica al interconectar la hidrólisis del ATP con la translocación del precursor proteico a través de la membrana plasmática (Mori e Ito, 2001; Driessen y Van der Does, 2002; Rusch y Kendall, 2007). La sucesión de ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana acoplados a la

hidrólisis de ATP por esta proteína resulta en la translocación del precursor proteico que, una vez procesado por la peptidasa señal, será liberado al medio extracelular (Driessen y Van der Does, 2002; Lewin, 2004; Natale *et al.*, 2008).

II.2.2.5.3.2.4. Peptidasa señal

Las peptidasas señal son endopeptidasas de membrana encargadas de la eliminación del SP de las preproteínas durante o inmediatamente después de su translocación a través de la membrana. De manera general, las peptidasas señal pueden clasificarse en dos tipos: (i) I, que incluye a aquellas que actúan sobre precursores de proteínas distintas de las lipoproteínas y (ii) II, que engloba a las que se encargan del procesamiento de precursores de lipoproteínas (Paetzel *et al.*, 2002; Van Roosmalen *et al.*, 2004). En bacterias Gram-negativas, la peptidasa señal de tipo I mejor caracterizada es la de *Ec.coli*, denominada Lep (del inglés *Leader peptidase*). En bacterias Gram-positivas, a diferencia de lo que ocurre en las Gram-negativas, es frecuente la existencia de múltiples peptidasas señal; así, por ejemplo, en *B. subtilis* se han descrito cinco de estas endopeptidasas, denominadas SipS, SipT, SipU, SipV y SipW, que muestran especificidades de sustrato distintas. Con respecto a su mecanismo catalítico, las peptidasas señal se engloban dentro de un grupo especial de serín peptidasas debido a que contienen residuos estrictamente conservados de Ser, Lys y Asp esenciales para su actividad (Van Roosmalen *et al.*, 2004). Asimismo, se conoce que estas enzimas presentan especificidad por las posiciones -3 y -1 (con respecto al punto de corte) del SP, las cuales suelen estar ocupadas por aminoácidos con cadenas laterales cortas y neutras, como Ala, Gly, Ser o Thr. El resultado final del procesamiento del SP por la peptidasa señal consiste en la liberación de la proteína en su forma madura al espacio periplásmico o extracelular y la adopción por parte de la misma de su conformación nativa definitiva.

Hasta la fecha, solamente se han descrito algunas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, como la acidocina B (Leer *et al.*, 1995), la divergicina A (DivA) (Worobo *et al.*, 1995), EntP (Cintas *et al.*, 1997; Herranz y Driessen, 2005), Lcn972 (Martínez *et al.*, 2000a), EnlA (Nilsen *et al.*, 2003), la bacteriocina 32 (Inoue *et al.*, 2006), bacteriocina T8 (de Kwaadsteniet *et al.*, 2006), la enterocina V583 (Swe *et al.*, 2007) y la hiracina JM79 (HirJM79) (Sánchez *et al.*, 2007), cuyos precursores se sintetizan con extensiones N-terminales del tipo SP. La presencia de este tipo de extensiones en las bacteriocinas tiene implicaciones importantes tanto para su propia producción heteróloga como por su posible utilización para la producción heteróloga de otras bacteriocinas codificadas con extensiones terminales del tipo doble glicina, como se describirá en la sección II.2.2.9.

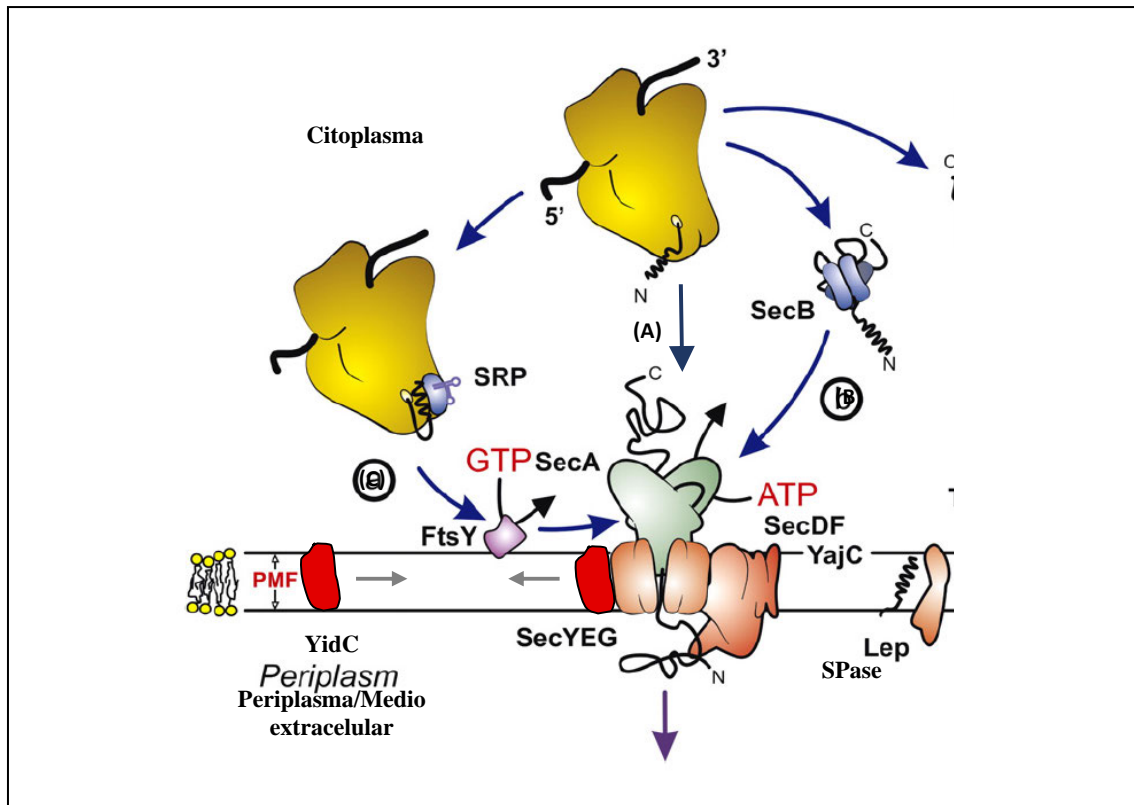


Figura 2.8. Transporte y procesamiento de proteínas mediante la ruta Sec. En las bacterias, los componentes principales de la translocasa Sec son: (i) la proteína periférica de membrana SecA (en verde), que actúa como motor del proceso de translocación mediante la hidrólisis de ATP; (ii) el complejo proteico SecYEG (en marrón), que constituye el canal conductor de los precursores proteicos a través de la membrana; (iii) las proteínas de membrana SecDF y YajC (en marrón) que incrementan la eficiencia del proceso de translocación, y (iv) YidC (en rojo), una proteína implicada en la inserción de proteínas de membrana. Cuando una proteína provista de un péptido señal (SP) emerge del ribosoma puede alcanzar la translocasa postraduccionalmente o simultáneamente a su traducción. En el primer caso, la preproteína se asocia directamente con el núcleo de la translocasa (A) o bien es conducida hacia el mismo por la chaperona SecB (B). En el segundo caso, la preproteína se asocia con la partícula reconocedora de señal (SRP) y, a través de FtsY (en violeta), interacciona con el núcleo de la translocasa (C). Finalmente, la peptidasa señal (SPase, en naranja) es una proteína de membrana encargada de eliminar el SP del precursor proteico durante o inmediatamente después de su translocación. PMF: Fuerza Protón Motriz (del inglés *Proton Motive Force*). Adaptado de Natale et al. (2008).

II.2.2.5.4. Genes de regulación de la producción: sistema de transducción de señal de tres componentes

Dado que la producción de bacteriocinas puede ser considerada como un proceso dirigido a la inhibición de la microbiota que compite con el microorganismo productor por un sustrato o nutriente limitado, parece razonable considerar que la capacidad de producir bacteriocinas de forma regulada en función de los niveles de algun(os) factor(es) ambiental(es) puede representar una ventaja adaptativa para la cepa bacteriocinogénica favorecida por la selección natural (Skaugen *et al.*, 2003). En este sentido, en cultivos de laboratorio se ha observado que la capacidad de producir bacteriocinas puede perderse por diversas razones como, entre otras, la

dilución de las células productoras en un medio líquido por debajo de un nivel umbral o su incubación a determinadas temperaturas (Diep *et al.*, 1995; Eijnsink *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Nes y Eijnsink, 1999; Diep *et al.*, 2000; Eijnsink *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003). En este sentido, se ha descrito la existencia de mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de la producción de algunas bacteriocinas, como en el caso de EntA de *E. faecium* CTC492 (Nilsen *et al.*, 1998), NisA de distintas cepas de *L. lactis* (Kuipers *et al.*, 1995), PltN, PltEF y PltJK de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998), sakacina A (SakA) de *Lactobacillus sakei* Lb706 (Axelsson y Holck, 1995) y SakP de *Lb. sakei* LTH673 (Eijnsink *et al.*, 1996). En estos sistemas, la regulación de la producción de bacteriocinas depende de un sistema de transducción de señal que generalmente consta de tres componentes: (i) un péptido inductor (IP, del inglés *Inducing Peptide*), conocido también como factor de inducción, molécula señal o feromona; (ii) una proteína sensora histidín-quinasa (HPK, del inglés *Histidine Protein Kinase*), que funciona como sensor de señales específicas y (iii) una proteína reguladora de respuesta (RR, del inglés *Response Regulator*), que, tras ser activada por una HPK específica, desencadena la respuesta adaptativa del hospedador (Nes *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997; Nes y Eijnsink, 1999; Kleerebezem y Quadri, 2001; Van der Ploeg, 2005). En lo que respecta a los genes que codifican estos componentes conviene destacar que pueden constituir un operón independiente (*e.g.*, PltEF y PltJK) o bien formar parte del operón en el que se localizan el gen estructural y/o el de transporte (*e.g.*, CbnB2).

A continuación se describen los componentes y funcionamiento de este sistema de regulación.

II.2.2.5.4.1. Péptido inductor

Los IP son moléculas de pequeño tamaño molecular, con o sin modificaciones postraduccionales, que constituyen la señal inicial de los sistemas reguladores de tres componentes y que controlan la biosíntesis de determinadas bacteriocinas, permitiendo su producción de manera rápida y “explosiva” mediante un mecanismo de autoinducción (Nes y Eijnsink, 1999). Conviene destacar que los IP presentan similitudes estructurales con las bacteriocinas (Nes y Eijnsink, 1999), ya que: (i) son catiónicos, parcialmente anfipáticos y con capacidad de adoptar una estructura en hélice α y (ii) se sintetizan en forma de precursores con una secuencia líder, generalmente del tipo Gly-Gly, lo que sugiere que los IP y bacteriocinas podrían ser procesados y secretados por el mismo transportador del tipo ABC. No obstante, los IP también presentan características que, claramente, los diferencian de las bacteriocinas (Nes y Eijnsink, 1999; Skaugen *et al.*, 2003), como son: (i) su menor tamaño molecular (19–26 aa) con respecto a las bacteriocinas (>30 aa); (ii) la ausencia de actividad antimicrobiana, exceptuando el caso del IP del sistema de las plantarinas de *Lb. plantarum* C11 (Anderssen *et al.*, 1998) y los casos en los que las bacteriocinas (*e.g.*, NisA) inducen su propia síntesis (Kuipers *et al.*, 1995) y (iii) su elevada potencia, ya que poseen actividad biológica a concentraciones (aprox., 0,1 nM) menores que las requeridas para que las bacteriocinas ejerzan su efecto antimicrobiano

(orden picomolar-nanomolar). Por otra parte, aunque existe una homología significativa entre los IP descritos hasta la fecha, estos actúan, generalmente, de manera muy específica para cada cepa (Brurberg *et al.*, 1997; Nes y Eijsink, 1999). Asimismo, el gen que codifica el IP se cotranscribe generalmente con los genes de las proteínas HPK y RR (Nes y Eijsink, 1999). Como resultado de la acción del IP se produce tanto la expresión de los genes necesarios para la producción e inmunidad de las bacteriocinas como la autoinducción del sistema de regulación (Nes y Eijsink, 1999).

II.2.2.5.4.2. Proteína histidín-quinasa y proteína reguladora de respuesta: transducción de señal

Las HPK de los sistemas reguladores contienen tres dominios: (i) un dominio sensor N-terminal, localizado en la cara externa de la membrana citoplasmática, que detecta la presencia del IP; (ii) un dominio central o de membrana, rico en aminoácidos hidrofóbicos que presumiblemente forman 6–8 hélices α transmembran, y (iii) un dominio C-terminal de unión al ATP (también denominado dominio transmisor), que posee actividad autoquinasa y contiene un residuo de histidina (His) conservado que constituye el lugar de fosforilación (Nes y Eijsink, 1999). Por otra parte, las RR poseen dos dominios: (i) un dominio N-terminal, que contiene un residuo de ácido aspártico (Asp) conservado que representa el lugar de fosforilación y (ii) un dominio receptor C-terminal, que media la respuesta adaptativa (Nes *et al.*, 1996).

El mecanismo de inducción de estos sistemas de transducción de señal consiste en una serie de reacciones de fosforilación y desfosforilación acopladas que se desarrollan en cinco etapas: (i) unión del IP al dominio sensor de la HPK; (ii) autofosforilación de la HPK; (iii) desfosforilación de la HPK y fosforilación acoplada del dominio receptor de la proteína RR; (iv) interacción de la proteína RR con secuencias específicas situadas en la región promotora de los genes diana y, por último, (v) activación de la transcripción de los genes implicados en la producción de las bacteriocinas (Nes y Eijsink, 1999). A este respecto, conviene destacar que la estructura de la región promotora de los genes regulados mediante este sistema es atípica, ya que contiene: (i) una secuencia –10 muy conservada; (ii) una secuencia –35 poco conservada que, por lo tanto, es difícilmente reconocible, y (iii) dos secuencias adicionales características con las que interacciona la proteína RR, denominadas secuencias –80 y –40, que contienen secuencias repetidas directas o inversas de aprox. 10 pb separadas entre sí por una distancia de 12–13 pb (equivalente aproximadamente a dos vueltas en la cadena de ADN) (Diep *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Risøen *et al.*, 1998; Nes y Eijsink, 1999; Risøen *et al.*, 2000; Van der Ploeg, 2005; Fontaine *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, se han propuesto dos modelos para explicar el proceso de inducción de la síntesis de bacteriocinas. Según el modelo de regulación por densidad celular (del inglés *Quorum Sensing*), el IP se produce de forma constitutiva en pequeñas cantidades, acumulándose progresivamente durante el crecimiento celular, de tal forma que cuando se alcanza el nivel

umbral requerido para ejercer la autoinducción, se incrementa la expresión de todos los genes de la agrupación génica de la bacteriocina. El modelo alternativo propone que la producción de IP ocurre a un nivel ligeramente inferior al necesario para la autoinducción, siendo la presencia de ciertas condiciones ambientales la responsable del aumento transitorio de su producción, de manera que cuando se supera el nivel umbral, se induce su propia síntesis y la del resto de genes de la agrupación génica de la bacteriocina (Nes *et al.*, 1996; Nes y Eijsink, 1999; Straume *et al.*, 2007).

II.2.2.6. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS DEL GÉNERO *Streptococcus*

La producción de bacteriocinas por especies del género *Streptococcus* se describió en la década de los sesenta (Mindich, 1966). Desde entonces, se han identificado numerosas bacteriocinas estreptocócicas cuyas denominaciones se han establecido en función de la especie productora (*e.g.*, bovicina HJ50 [Xiao *et al.*, 2004], termofilina 1277 [Kabuki *et al.*, 2007] y macedovicina [Georgalaki *et al.*, 2013]), o de las cepas productoras dentro de una misma especie (mutacina II/ mutacina H29-B [Chikindas *et al.*, 1995b; Nicolas *et al.*, 2006], y mutacina 1140/ mutacina III [Hillman *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 1999]) (Tabla II.14).

Las bacteriocinas producidas por estreptococos descritas hasta la fecha pueden clasificarse en dos grupos atendiendo a su origen (Tabla II.14). En este contexto, el primer grupo está constituido por bacteriocinas producidas por especies estreptocócicas aisladas de muestras humanas, entre las que se incluyen *S. salivarius*, que forma parte de la microbiota comensal de la cavidad oral (Ross *et al.*, 1993; Tagg *et al.*, 2004; Wescombe *et al.*, 2006; Wescombe *et al.*, 2011), y especies patógenas, entre las que destaca *S. mutans*, responsable de la enfermedad periodontal y la producción de caries (Chikindas *et al.*, 1995; Mota-Meira *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1999, 2000, 2001; Yonezawa y Kuramitsu, 2005; Petersen *et al.*, 2006; Robson *et al.*, 2007; Nicolas *et al.*, 2011), y *S. pyogenes*, responsable de procesos infecciosos como la faringitis (Wescombe *et al.*, 2003, 2006). Por otra parte, el segundo grupo está integrado por las bacteriocinas producidas por estreptococos aislados de animales y alimentos de origen animal. A este respecto se ha descrito la producción de bacteriocinas por *S. bovis* aislados del rumen y leche cruda bovina (Whitford *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004), *S. uberis*, principal responsable de la mastitis bovina aislados frecuentemente de piel, ubre y leche cruda de vaca (Wirawan *et al.*, 2006, 2007; Heng *et al.*, 2007) y *S. macedonicus* (Georgalaki *et al.*, 2002, 2013) y *S. thermophilus* aislados de quesos y leche cruda (Marciset *et al.*, 1997; Aktypis *et al.*, 1998; Gilbreth y Somkuti, 2005; Kabuki *et al.*, 2007).

Tabla II.14. Bacteriocinas producidas por *Streptococcus* spp.

Clase/ Bacteriocina	Subclase	Cepa productora	Fuente	Referencia
Clase I				
Bovicina HC5	Ia	<i>S. bovis</i> HC5	Rumen (bovino)	Mantovani <i>et al.</i> (2002)
Bovicina HJ50	Ia	<i>S. bovis</i> HJ50	Leche cruda (bovino)	Xiao <i>et al.</i> (2004)
Estreptina	Ia	<i>S. pyogenes</i> M25	NE	Wescombe <i>et al.</i> (2003)
Estreptococina A-FF22	Ia	<i>S. pyogenes</i> A-FF22	NE	Tagg <i>et al.</i> (1971)
Macedocina	Ia	<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	Kasseri ^c	Georgalaki <i>et al.</i> (2002)
Macedovicina	Ia	<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	Kasseri ^c	Georgalaki <i>et al.</i> (2013)
Mutacina I	Ia	<i>S. mutans</i> CH43	Caries (humano)	Qi <i>et al.</i> (2000)
Mutacina II (H29-B)	Ia	<i>S. mutans</i> T8 (29B)	Cavid oral (humano)	Chikindas <i>et al.</i> (1995b); Nicolas <i>et al.</i> (2006)
Mutacina III (1140)	Ia	<i>S. mutans</i> UA787 (JH1140)	Caries (humano)	Qi <i>et al.</i> (1999); Hillman <i>et al.</i> (1998)
Mutacina B-Ny266	Ia	<i>S. mutans</i> B-Ny266	NE ^b	Mota-Meira <i>et al.</i> (1997)
Mutacina K8	Ia	<i>S. mutans</i> K8	Placa dental (humano)	Robson <i>et al.</i> (2007)
Nisina U	Ia	<i>S. uberis</i> 42	NE ^b	Wirawan <i>et al.</i> (2006)
Salivaricina A	Ia	<i>S. salivarius</i> 20P3	Cavid oral (humano)	Ross <i>et al.</i> (1993)
Salivaricina A1 (variante)	Ia	<i>S. pyogenes</i> 140	Cavid oral (humano)	Wescombe <i>et al.</i> (2006)
Salivaricina A2 (variante)	Ia	<i>S. salivarius</i> K12	Cavid oral (humano)	Tagg (2004)
Salivaricina A3 (variante)	Ia	<i>S. salivarius</i> JH	Cavid oral (humano)	Wescombe <i>et al.</i> (2006)
Salivaricina A4 (variante)	Ia	<i>S. salivarius</i> 9	Cavid oral (humano)	Wescombe <i>et al.</i> (2006)
Salivaricina A5 (variante)	Ia	<i>S. salivarius</i> H21f	Cavid oral (humano)	Wescombe <i>et al.</i> (2006)
Salivaricina B	Ia	<i>S. salivarius</i> K12	Cavid oral (humano)	Tagg (2004)
Salivaricina D	Ia	<i>S. salivarius</i> 5M6c	Heces (humano)	Birri <i>et al.</i> (2011)
Salivaricina 9	Ia	<i>S. salivarius</i> 9	Cavid oral (humano)	Wescombe <i>et al.</i> (2011)
Salivaricina G32	Ia	<i>S. salivarius</i> G32	Cavid oral (humano)	Wescombe <i>et al.</i> (2012a)
SmbA-SmbB	Ia	<i>S. mutans</i> GS5	Cavid oral (humano)	Yonezawa y Kuramitsu (2005); Petersen <i>et al.</i> (2006)
Termofilina T	NC ^a	<i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0040	Queso Feta	Aktypis <i>et al.</i> (1998)
Termofilina 1277	Ia	<i>S. thermophilus</i> SBT1277	Leche cruda	Kabuki <i>et al.</i> (2007)
Clase II				
Bovicina 255	Ile	<i>S. gallolyticus</i> LRCO255	Rumen (bovino)	Whitford <i>et al.</i> (2001)
Mutacina IV	Iib	<i>S. mutans</i> UA140	Caries (humano)	Qi <i>et al.</i> (2001)
Mutacina F-59.1	Ila	<i>S. mutans</i> F-59.1	NE ^b	Nicolas <i>et al.</i> (2011)
Mutacina N	Ile	<i>S. mutans</i> N	Placa dental (adulto)	Balakrishnan <i>et al.</i> (2000)
Termofilina 13 (ThmA y ThmB)	Iib	<i>S. thermophilus</i> SFi13	NE ^b	Marciset <i>et al.</i> (1997)
Termofilina 110	Iib	<i>S. thermophilus</i> ST110	Leche cruda	Gilbreth <i>et al.</i> (2005)
Ubericina A	Ila	<i>S. uberis</i> E	NE ^b	Heng <i>et al.</i> (2007)
Uberolisina	Iid	<i>S. uberis</i> 42	NE ^b	Wirawan <i>et al.</i> (2007)

^aNC, no caracterizada; ^bNE, no especificada; ^cKasseri, queso elaborado a partir de leche de oveja y/o cabra típico de Grecia y Turquía.

Por otra parte, existe una relación entre el espectro de actividad antimicrobiana y el origen de la cepa productora. A este respecto, las bacteriocinas producidas por estreptococos de origen humano ejercen actividad antimicrobiana generalmente frente a otras especies de su mismo género, destacando dentro de este grupo las bacteriocinas de *S. salivarius*, caracterizadas por presentar un efecto inhibitorio frente a estreptococos que actúan como patógenos potenciales de la cavidad oral y el aparato respiratorio, entre los que se encuentran *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. Sin embargo, las bacteriocinas producidas por estreptococos aislados de bovinos presentan un espectro de acción amplio que incluye una gran diversidad de especies, entre las que se encuentran *St. aureus*, *E. faecalis*, *L. lactis*, *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus curvatus*, *B. subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Leuconostoc mesenteroides*. Finalmente, las bacteriocinas producidas por especies estreptocócicas aisladas de alimentos ejercen su acción antimicrobiana principalmente frente a bacterias patógenas responsables de toxiinfecciones alimentarias como *Ls. monocytogenes*, *Cl. botulinum* y *B. cereus*, así como frente a bacterias responsables de la alteración y deterioro de los alimentos como *Cl. tyrobutyricum* y *Cl. sporogenes* o especies del género *Pediococcus*. A pesar de que se han

descrito algunas bacteriocinas estreptocócicas de la clase II, la mayoría de las caracterizadas hasta la fecha pertenecen al grupo de los lantibióticos (sección II.2.2.1) y, dentro éste, a la subclase Ia (lantibióticos elongados, flexibles y catiónicos). Además, algunos de estos lantibióticos están constituidos por sistemas de dos péptidos, como los péptidos Smb-A y Smb-B producidos por *S. mutans* GS5 (Yonezawa y Kuramitsu, 2005). En lo que respecta a la organización genética, los genes que codifican las bacteriocinas estreptocócicas que se han descrito se localizan en: (i) un plásmido, como en el caso de la mayoría de los lantibióticos producidos por *S. salivarius* (Tagg, 2004; Wescombe *et al.*, 2011) y la estreptococina A-FF22 producida por *S. pyogenes* A-FF22 (Hynes *et al.*, 1993) o (ii) el cromosoma, como es el caso de la mayor parte de las mutacinas (Qi *et al.*, 2000, 2001; Yonezawa y Kuramitsu, 2005), bovicina HJ50, uberolisina (Wirawan *et al.*, 2007), termofilina 1277 y termofilina 110 (Gilbreth y Somkuti, 2005).

II.2.2.7. APLICACIONES

II.2.2.7.1. Bacteriocinas como agentes terapéuticos

El incremento de la aparición de resistencias bacterianas a los antibióticos ha estimulado la búsqueda de nuevas estrategias antimicrobianas que resulten efectivas para el tratamiento de las infecciones humanas y animales. A este respecto, las bacteriocinas podrían constituir una alternativa eficaz, por lo que se han llevado a cabo numerosos estudios, fundamentalmente con lantibióticos, y, en menor medida, con bacteriocinas de la clase II, para evaluar su potencial como agentes terapéuticos en medicina humana y/o animal. Así pues, entre las aplicaciones para las que se ha propuesto su empleo (Ryan *et al.*, 2002; Joerger, 2003; Cotter *et al.*, 2005a, b; Gillor *et al.*, 2005; Guinane *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007; Gillor y Ghazaryan, 2007; Sit y Vederas, 2008; Montalbán-López *et al.*, 2011; Lohans y Vederas, 2012; Cotter *et al.*, 2013) cabe destacar las siguientes:

1. Tratamiento de la úlcera péptica causada por *HL. pylori*. Dado que NisA es efectiva *in vitro* frente a *HL. pylori*, se ha propuesto su empleo para el tratamiento de esta enfermedad, ya que, además, es insensible a la pepsina gástrica (pero no a las proteasas pancreáticas) y, en general, su actividad antimicrobiana está favorecida a pH ácido (característico del estómago) (Piper *et al.*, 2009a).
2. Tratamiento y prevención de la mastitis bovina causada por *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. A este respecto, NisA es el ingrediente activo de dos productos antimicrobianos (CONCEPT® [solución] y WIPE-OUT® [toallita]) comercializados por Immunocell (Portland, Maine, EE. UU.) para el tratamiento de la mastitis (Ryan *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2005a; Díez-González, 2007). Por otra parte, dado que la lacticina 3147 (Ltn3147 [Ltn α y Ltn β]), producida por *L. lactis* (Ryan *et al.*, 1996), inhibe a todos los microorganismos Gram-positivos productores de mastitis

evaluados hasta la fecha, se ha investigado su empleo en el tratamiento y/o la prevención de este proceso como alternativa a los tratamientos antibióticos intramamarios, habiéndose demostrado que un sellador mamario que contiene Ltn3147 llamado TEAT SEAL® (Cross Vetpharm Group Ltd., Dublin, Irlanda) protege eficazmente a los animales frente a *S. dysgalactiae* y *St. aureus* (Ryan *et al.*, 1998, 1999; Twomey *et al.*, 2000; Crispie *et al.*, 2005; Díez-González, 2007). Asimismo, se ha sugerido que las bacteriocinas producidas por cepas de *Staphylococcus* spp. coagulasa-negativas activas frente a otras cepas estafilocócicas productoras de mastitis podrían ser igualmente útiles para el tratamiento y/o la prevención de la mastitis causada por *Streptococcus* spp. (Dos Santos-Nascimento *et al.*, 2005, 2006; Varella-Coelho *et al.*, 2007).

3. Tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos. Se ha demostrado que las cepas de *St. aureus* (MRSA) y de *E. faecalis* (VRE) son sensibles a NisA y Ltn3147, mersacidina y actagardina, producidas por *L. lactis*, *B. subtilis* y *Actinoplanes* spp., respectivamente, por lo que estos lantibióticos tienen potencial para prevenir/tratar infecciones en las que el tratamiento antibiótico es indeseado o inefectivo (Guder *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2002; Piper *et al.*, 2009a).
4. Tratamiento del acné causado por *Propionibacterium acnes*. Los lantibióticos Ltn3147, epidermina y gallidermina, producidos por *L. lactis*, *St. aureus* y *Staphylococcus gallinarum*, respectivamente, son efectivos frente a *Pr. acnes* y, además, son activos a pH fisiológico, por lo que podrían utilizarse en formulaciones tópicas para el tratamiento del acné (Ross *et al.*, 1999; Pag y Sahl, 2002a,b; Guinane *et al.*, 2005; Piper *et al.*, 2009a).
5. Prevención de la enfermedad periodontal y tratamiento/prevención de la caries dental causada por *S. mutans*. Diversos lantibióticos (*e.g.*, NisA y mutacinas) incorporados en colutorios bucales pueden ser útiles para prevenir la enfermedad periodontal (Ryan *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2007). Por otra parte, Ltn3147 es activa frente a *S. mutans*, por lo que su incorporación en pastas dentales y colutorios bucales podría resultar eficaz para la prevención de la caries dental (Guinane *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2006; Dobson *et al.*, 2011). Asimismo, las salivaricinas A2 y B, lantibióticos producidos por *S. salivarius* K12, han mostrado su eficacia en la prevención de la aparición de caries producidas por *S. mutans* y *S. sobrinus* (Gillor y Ghazaryan, 2007).
6. Prevención de la faringitis producida por *S. pyogenes*, que causa asimismo mal aliento. Algunas cepas del género *Streptococcus* productoras de lantibióticos efectivos frente a *S. pyogenes* (*e.g.*, cepas de *S. mutans* y *S. salivarius* productoras de mutacina 1140 y salivaricinas A2 y B, respectivamente) pueden ser útiles para el tratamiento de este tipo de faringitis, por lo que podrían utilizarse como terapia de sustitución de los antibióticos (Tagg, 2004; Cotter *et al.*, 2005b; Wescombe *et al.*, 2012b; Di Pierro *et al.*, 2012).

7. Tratamiento de las infecciones pulmonares causadas por *Ps. aeruginosa* mediante la administración de piocinas modificadas genéticamente (Michel-Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Asimismo, se ha sugerido el empleo de una terapia combinada de NisA con polimixina E y claritromicina en el tratamiento de infecciones causadas por cepas resistentes de *Ps. aeruginosa* (Piper *et al.*, 2009a). Por otra parte, recientemente se ha descrito la actividad antagonista de una bacteriocina producida por *Lb. acidophilus* frente a cepas de *Ps. aeruginosa* aisladas de catéteres urinarios resistentes a diversos antibióticos y formadoras de *biofilms* (Al-Mathkhury *et al.*, 2011).
8. Prevención y tratamiento de infecciones producidas por bacterias patógenas entéricas (*e.g.*, *Ec. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* y *Campylobacter* spp.) mediante la administración de cepas de bacterias Gram-negativas productoras de bacteriocinas (colicinas o microcinas) o de bacteriocinas (producidas por *Bacillus* spp. o *Paenibacillus* spp.) microencapsuladas que, posiblemente, reducen o previenen la adquisición de nuevas cepas patógenas (Zhao *et al.*, 1998; Gillor *et al.*, 2005; Cole *et al.*, 2006; Díez-González, 2007).
9. Tratamiento de infecciones virales. La cinamicina, lantiopeptina y la enterocina CRL35 (EntCRL35), producidas por *Streptomyces* spp., *Streptoverticillium cinnamoneum* y *E. mundtii* CRL35, respectivamente, inhiben la replicación del virus herpes simple (Ryan *et al.*, 2002; Wachsmann *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito que la enterocina ST4V (EntST4V) producida por *E. mundtii* ST4V inactiva diversos virus (Todorov *et al.*, 2005) y que la bacteriocina ST5Ha producida por *E. faecium* ST5Ha, presenta actividad frente al virus HSV-1 (Todorov *et al.*, 2010).

II.2.2.7.1.1. Empleo de técnicas de ingeniería genética para mejorar el potencial terapéutico de las bacteriocinas

Los avances en el conocimiento de la organización genética y los procesos que intervienen en la biosíntesis de las bacteriocinas han permitido el desarrollo de técnicas que persiguen la mejora del potencial terapéutico de estos péptidos antimicrobianos, incluyendo un incremento de su estabilidad, potencia y espectro de acción, con el objeto de poder emplearlos con éxito en el ámbito clínico (Pag y Sahl, 2002; Gillor *et al.*, 2005; Lohans y Vederas, 2012; Molloy *et al.*, 2012; Cotter *et al.*, 2013). Así, por ejemplo, a pesar de que NisA se caracteriza por poseer un gran potencial terapéutico basado en la ausencia de citotoxicidad y su potente espectro de acción frente a numerosos patógenos de relevancia clínica, la baja solubilidad/estabilidad de este péptido a pH fisiológico limita su empleo como agente terapéutico a nivel sistémico. A este respecto, la utilización de técnicas de ingeniería genética, más sencillas de aplicar que en el caso de los antibióticos clásicos debido a la naturaleza exclusivamente peptídica de las bacteriocinas, que modifiquen la estabilidad/solubilidad y/o el espectro de acción de las bacteriocinas, permitirían optimizar su aplicabilidad (Mayville *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Qui *et al.*, 2003;

Gillor *et al.*, 2005). A este respecto, el empleo de la técnica de mutagénesis dirigida o al azar sobre el gen estructural de péptidos precursores, especialmente en el caso de los lantibióticos, ha permitido la obtención de péptidos con propiedades mejoradas, tales como actividad a un pH más amplio, mejor estabilidad y mayor habilidad de unión a las células diana, lo que resulta en una mejora de sus propiedades antimicrobianas. Así, por ejemplo, los péptidos resultantes de las mutaciones N20K y M21K en la región “bisagra” del lantibiótico NisZ muestran una mayor actividad frente a diferentes especies de *Shigella*, *Pseudomonas* y *Salmonella* y una mayor solubilidad que NisZ producida por la cepa salvaje, mientras que los mutantes N20Q y M21Q poseen una mayor estabilidad a altas temperaturas y valores de pH neutros y alcalinos (Piper *et al.*, 2009a; Healy *et al.*, 2013).

Por otra parte, además de la administración de la bacteriocina purificada, el potencial terapéutico de las bacteriocinas podría explotarse mediante la administración de cepas (probióticas) que las produzcan *in situ* de forma natural o mediante su modificación genética, pudiendo en este último caso diseñarse cepas productoras de determinadas bacteriocinas en función de las necesidades terapéuticas. Aunque, en principio, las cepas seleccionadas para este fin no deben ser patógenas para el hospedador, la aplicación de técnicas de ingeniería genética también puede facilitar el aprovechamiento de su potencial terapéutico. Así por ejemplo, en *S. mutans*, responsable tanto de causar caries en la cavidad oral como de la producción de una serie de bacteriocinas (mutacinas) activas frente a otros microorganismos presentes en la placa dental, la sustitución del gen que codifica la enzima lactato deshidrogenasa por el de la enzima alcohol deshidrogenasa permitió mantener la capacidad de colonización de la cepa, así como de producción de las mutacinas, eliminando su potencial patógeno (Hillman *et al.*, 2000; Gillor *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2013).

II.2.7.2. Bacteriocinas en la industria alimentaria

En el ámbito de la industria alimentaria, se ha propuesto la aplicación de las bacteriocinas para los siguientes fines:

1. Mejora de las características organolépticas de los quesos (*e.g.*, LcnA, LcnB, LcnM, Ltn481 y EntAS-48) debido a su acción lítica sobre las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores, lo que provoca la liberación de sus enzimas intracelulares, y, por lo tanto, la aceleración de la maduración del queso (Ross *et al.*, 1999; Martínez-Cuesta *et al.*, 2001; Oumer *et al.*, 2001; O’Sullivan *et al.*, 2002b; Peláez y Requena, 2005).
2. Mejora de la calidad higiénico-sanitaria y organoléptica de los alimentos debido a su capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y/o alterantes, incluyendo dentro de estos últimos a la microbiota láctica que no forma parte del cultivo iniciador en determinados alimentos fermentados (*e.g.*, quesos y vinos). Esta estrategia, conocida como bioconservación, se desarrollará en el siguiente apartado

debido a su gran relevancia como alternativa al empleo de aditivos en la conservación de los alimentos.

II.2.2.7.2.1. Bioconservación de los alimentos

La mayoría de las técnicas de conservación de los alimentos disponibles actualmente en la industria alimentaria se basan en el empleo de aditivos. Sin embargo, cada vez más consumidores demandan productos “más naturales”, menos procesados e, incluso, libres de aditivos “químicos”. En este contexto, la bioconservación es una alternativa que permite satisfacer la demanda de los consumidores actuales garantizando a la vez la seguridad de los alimentos. La bioconservación se define como “la prolongación de la vida útil y el incremento de la seguridad y la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de compuestos naturales de origen animal, vegetal o microbiano que no ejercen efectos perjudiciales sobre la salud de los consumidores” (Stiles, 1996; Cintas y Casaús, 1998) y también como “la prolongación de la vida útil y el incremento de la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de la microbiota natural o sus metabolitos” (Schillinger *et al.*, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Ross *et al.*, 2002). Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios que demuestran la eficacia de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus metabolitos como bioconservantes para inhibir el desarrollo y/o eliminar la presencia de un gran número de microorganismos patógenos y alterantes presentes en diversos alimentos (*e.g.*, leche, quesos, productos cárnicos, vegetales, pescados, mariscos, ensaladas, alimentos enlatados, ovoproductos, vino, cerveza, bebidas analcohólicas y productos de panadería) (O’Sullivan *et al.*, 2002a; Työppönen *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005b; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Basanta, 2007; Calo-Mata *et al.*, 2008; Ndaw *et al.*, 2008; El Bassi *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2010). Conviene destacar que de los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas (sección II.1.2), las bacteriocinas producidas por microorganismos de los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* poseen un gran potencial como bioconservantes en la industria alimentaria (Abee *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; McMullen y Stiles, 1996; Schillinger *et al.*, 1996; Cintas y Casaús, 1998; Cotter *et al.*, 2005b; Gálvez *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2010) debido a las siguientes características:

1. Su producción por bacterias que son consideradas microorganismos GRAS y/o QPS (Schillinger *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2000b) (sección II.1.3.2.2).
2. Naturaleza proteica (sección II.2.2.2), por lo que se inactivarían por las enzimas proteolíticas del tracto digestivo (principalmente gástricas) (Piard y Desmazeaud, 1991; Cotter *et al.*, 2005b; Bernbom *et al.*, 2006) y, por lo tanto, no originarían disbiosis intestinales.
3. Ausencia de capacidad inmunógena, por lo que no ocasionarían episodios alérgicos.

4. Amplio espectro de acción antimicrobiana y potente actividad frente a microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en diversos alimentos, como *Ls. monocytogenes*, *St. aureus* y *Cl. botulinum* (sección II.2.2.3). Además, pueden actuar sinérgicamente con otros sistemas de conservación de los alimentos (Gould, 1996)
5. Resistencia a diversos tratamientos tecnológicos de conservación aplicados a los alimentos (e.g., pasteurización, liofilización y acidificación).

Asimismo, algunas bacteriocinas producidas por cepas de origen lácteo pertenecientes al género *Streptococcus*, como la macedocina y las termofilinas (Aktypis *et al.*, 1998; Georgalaki *et al.*, 2002; Kabuki *et al.*, 2007; Marciset *et al.*, 1997; Gilbreth y Somkuti, 2005), también presentan un gran potencial para su aplicación en la industria alimentaria para la conservación de alimentos fermentados, refrigerados y/o pasteurizados, especialmente los de origen lácteo, debido a su potente actividad frente a microorganismos alterantes y/o patógenos (*Listeria* spp., *Clostridium* spp. y *B. cereus*) y a sus propiedades tecnológicas, entre las que se incluyen: (i) estabilidad en condiciones extremas, como las que tienen lugar durante la fermentación de los productos lácteos; (ii) actividad antimicrobiana a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo; (iii) producción y estabilidad en leche en el rango de temperaturas 30–37 °C; (iv) resistencia a la renina; (v) compatibilidad con las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores; (vi) actividad anti-*Listeria* en leche, y (vii) estabilidad al calor (Messens y de Vuyst, 2002; Drider *et al.*, 2006; Todorov, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Nissen-Meyer *et al.*, 2010; Pérez, 2012).

De forma general, existen cuatro estrategias para la aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios: (i) inoculación del alimento con la bacteria láctica bacteriocinogénica para que produzca la bacteriocina *in situ* (cultivo protector y/o iniciador); (ii) adición de un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica (ingrediente alimentario); (iii) adición de la bacteriocina parcialmente purificada o purificada a homogeneidad (aditivo alimentario), y (iv) incorporación o inmovilización de la bacteriocina en el material de envasado de los alimentos con el fin de desarrollar un envase activo (Abee *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Ross *et al.*, 1999; Chikindas y Montville, 2002; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; De Vuyst y Leroy, 2007; Gálvez *et al.*, 2007; Blanco-Massani *et al.*, 2008, 2012). Conviene destacar que, si bien prácticamente cualquier bacteria láctica bacteriocinogénica y/o bacteriocina podría emplearse en la industria alimentaria bajo las dos primeras formas de aplicación, el empleo de bacteriocinas como aditivos alimentarios está sujeto a su inclusión previa en la lista positiva de estas sustancias, siendo en la actualidad NisA la única bacteriocina autorizada para tal fin en determinados alimentos. A este respecto, en la UE está permitida la utilización de NisA como conservante (E-234) en determinados tipos de quesos, productos lácteos y postres, mientras que en Australia y Nueva Zelanda está autorizada como bioconservante de la cerveza (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Riley y Wertz, 2002; Twomey *et al.*, 2002; Delves-Broughton, 2005). Debido a que para

la aceptación legal de una bacteriocina como aditivo alimentario se requieren numerosos estudios bioquímicos, genéticos y toxicológicos que suponen un coste económico muy importante (Schoeman *et al.*, 1999; Deegan *et al.*, 2006), es más factible que su empleo como bioconservante se realice mediante cualquiera de las otras estrategias. Así pues, existen ingredientes alimentarios consistentes en medios fermentados por cepas bacteriocinogénicas, como ALTA 2341TM (fermentado por *P. acidilactici*) (Daeschel, 1989; Cotter *et al.*, 2005b). Asimismo, la producción *in situ* de bacteriocinas representa una alternativa muy interesante, ya que no lleva asociado el coste adicional necesario para su empleo como aditivos alimentarios y, además, proporciona una fuente de bacteriocina más duradera (McMullen y Stiles, 1996; Benkerroum *et al.*, 2002). En lo que respecta al desarrollo de envases activos, recientemente, Blanco-Massani *et al.* (2008, 2012) han llevado a cabo estudios de incorporación o inmovilización de bacteriocinas, como lactocina 705 (Lac705 [Lac705 α y Lac705 β]) y NisA, en *films* de polietileno, concluyendo que este tipo de envases presenta un gran potencial para su aplicación en la conservación de alimentos.

No obstante, a pesar del potencial práctico de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en la industria alimentaria, la eficacia de estas sustancias y/o de las cepas bacteriocinogénicas en aplicaciones industriales puede resultar afectada por diversos factores (Nettles y Barefoot, 1993; Daeschel, 1993; Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Stiles, 1996; Callewaert *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2000b; Aasen *et al.*, 2003; Bhatti *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2007). A este respecto, entre los factores que afectan desfavorablemente a la capacidad bacteriocinogénica destacan: (i) la existencia de un ambiente inadecuado (*e.g.*, pH, temperatura y nutrientes) para la síntesis de bacteriocinas; (ii) la presencia de fagos que destruyan o retrasen el crecimiento de las cepas bacteriocinogénicas; (iii) la pérdida espontánea de tal capacidad (cuando sus determinantes genéticos se localizan en plásmidos u otros elementos genéticos transmisibles), y (iv) la incapacidad de la cepa bacteriocinogénica de desarrollarse debido a fenómenos de antagonismo ejercidos por otros microorganismos presentes en el alimento. Por otra parte, entre los factores que influyen negativamente en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas destacan: (i) la aparición de microorganismos resistentes; (ii) la existencia en el alimento de condiciones (*e.g.*, pH, proteasas, procesos oxidativos y aditivos alimentarios) que alteren su estructura y/o función; (iii) su unión a ciertos componentes de los alimentos (*e.g.*, proteínas y partículas de grasa), y (iv) la dificultad para lograr su solubilización y/o distribución uniforme en la matriz alimentaria, especialmente en los alimentos elaborados con materias primas sólidas o semisólidas. En cualquier caso, debe considerarse que las bacteriocinas pueden actuar sinérgicamente con otros métodos de conservación y/o compuestos antimicrobianos utilizados en la industria alimentaria, entre los que se incluyen: (i) ácidos orgánicos y sus sales, tales como los ácidos acético, cítrico, fítico y láctico y los benzoatos y sorbatos (Bari *et al.*, 2005; Ananou *et al.*, 2007); (ii) agentes químicos de grado alimentario que alteran la permeabilidad de las membranas externas de los microorganismos Gram-negativos (*e.g.*, EDTA) (Stevens *et al.*,

1991; Siragusa *et al.*, 1999), y (iii) tratamientos tecnológicos tales como térmicos, altas presiones o pulsos eléctricos (Gálvez *et al.*, 2007; Hereu *et al.*, 2012).

Por todo lo anterior, y de acuerdo con el concepto de la “tecnología de los obstáculos” (Leistner, 1992), las bacteriocinas deberían emplearse como un factor antimicrobiano adicional en un sistema de barreras constituido por múltiples y diversos factores (barreras o métodos) de conservación (físicos, químicos o biológicos) (Cleveland *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). De esta manera, gracias al efecto sinérgico antimicrobiano de diversos factores de conservación, podría reducirse la intensidad de los tratamientos aplicados y/o la concentración de sustancias potencialmente peligrosas en los alimentos y, así, aprovechar el potencial de las bacteriocinas como bioconservantes para la obtención de alimentos seguros, con un menor contenido de aditivos químicos y sometidos a tratamientos tecnológicos menos intensos (Leistner y Gorris, 1995; Leistner, 2000).

Con el fin de eliminar o reducir al mínimo los problemas expuestos anteriormente, los cuales suponen una importante limitación para la generalización del empleo de estos péptidos antimicrobianos como bioconservantes alimentarios, se han propuesto estrategias tales como: (i) empleo combinado de varias bacteriocinas con el objeto de aumentar su eficacia y espectro de acción antimicrobiana y reducir la tasa de aparición de poblaciones bacterianas resistentes (Schillinger *et al.*, 1996; Mulet-Powell *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2013); (ii) incorporación de bacteriocinas en los envases en contacto con los alimentos (Siragusa *et al.*, 1999; Scannell *et al.*, 2000; Cha *et al.*, 2003; Neetoo *et al.*, 2007; Blanco-Massani *et al.* 2008, 2012), y (iii) empleo de técnicas de ingeniería genética y/o proteica que permitan la expresión heteróloga de genes que codifican bacteriocinas en cultivos iniciadores y/o adjuntos (la producción de múltiples bacteriocinas o la obtención de moléculas con mayor estabilidad y/o solubilidad y con un espectro de actividad antimicrobiana más amplio (Fimland *et al.*, 1996, 1998; Quadri *et al.*, 1997a; Pag y Sahl, 2002a, b; Cotter *et al.*, 2005a; Gillor *et al.*, 2005; Gutiérrez, 2005)

II.2.2.7.3. Otras aplicaciones

Además de las aplicaciones descritas en las industrias farmacéutica y alimentaria, también se ha propuesto la utilización de las bacteriocinas con los siguientes fines:

1. Aditivos alimentarios para el ganado como alternativa a los antibióticos ionóforos con el objeto de mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal, limitando la pérdida de energía y nitrógeno a través de la producción microbiana de metano y amonio, respectivamente. En este contexto, una posible ruta de administración de las bacteriocinas sería mediante ensilados fermentados por bacterias bacteriocinogénicas (Kalmokoff *et al.*, 1996; Lauková y Czikková, 1998; Mantovani y Russell, 2002; Cookson *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005b; Díez-González, 2007; Giraffa *et al.*, 2010).
2. Tratamiento de aguas residuales procedentes de granjas (purines), ya que algunas bacteriocinas (*e.g.*, enterocina V24) inhiben a bacterias patógenas Gram-positivas (*e.g.*,

Ls. monocytogenes) y, en ocasiones, también a bacterias Gram-negativas (*e.g.*, *Yersinia enterocolitica*) presentes en estos sustratos (Lauková *et al.*, 1998, 2000).

3. Tratamiento de semillas de alfalfa con ciertas bacteriocinas (*e.g.*, colicina del tipo E2) para evitar la incidencia de *Ec. coli* O157:H7 en brotes de alfalfa (Nandiwada *et al.*, 2004).
4. Conservación de cosméticos y desodorantes (*e.g.*, mediante el empleo de gallidermina) (Ryan *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005a).
5. Prevención de la colonización por bacterias Gram-positivas y *Ec. coli* en catéteres tratados con NisA y colicinas, respectivamente (Bower *et al.*, 2001, 2002; Gillor *et al.*, 2005; Trautner *et al.*, 2005).
6. Tratamiento y prevención de diversas infecciones bacterianas en vegetales, ya que algunas bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas (*e.g.*, piocinas) inhiben a bacterias patógenas productoras de enfermedades en diversas especies vegetales (Gillor *et al.*, 2005).

Por último, se ha descrito que, además de su actividad antimicrobiana, las bacteriocinas poseen otras actividades biológicas, por lo que también se ha propuesto su empleo, entre otros, con los siguientes objetivos:

1. Inmunopotenciación y regulación de la presión sanguínea. Los lantibióticos duramicina y ancovenina, producidos por *Streptomyces* spp. y *Streptoverticillium* spp., respectivamente, y cinamicina, producida por *Streptomyces* spp., tienen efecto inmunomodulador y regulador de la presión sanguínea derivado de su actividad inhibidora de las enzimas fosfolipasa A2 (relacionada con la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos) y convertidora de angiotensina, respectivamente (Ryan *et al.*, 2002).
2. Tratamiento anticonceptivo y espermicida. Se ha descrito que NisA es eficaz como anticonceptivo (Aranha *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005b) y que Ltn3147 y la subtilisina A, producida por *Bacillus licheniformis*, son eficaces como espermicidas (Silkin *et al.*, 2008).
3. Agentes potencialmente anticancerígenos, debido a la capacidad de algunas bacteriocinas (*e.g.*, piocinas, colicinas y microcinas) de inhibir el crecimiento de las células eucariotas mediante la inducción de apoptosis o muerte celular programada de células cancerígenas (Hetz *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005; Lagos *et al.*, 2009; Shaikh *et al.*, 2012).
4. Tipificación de microorganismos mediante la determinación del patrón de producción de bacteriocinas con actividad frente a un conjunto estándar de microorganismos indicadores o del patrón de susceptibilidad frente a un conjunto estándar de

bacteriocinas; no obstante el empleo de esta técnica es poco frecuente, salvo en los casos en que resulta difícil su tipificación utilizando los métodos habituales (*e.g.*, micobacterias y algunos bacilos Gram-negativos) y, además, requiere que se utilicen métodos complementarios (Daw y Falkner, 1996).

II.2.2.8. RESISTENCIAS FRENTE A LAS BACTERIOCINAS

Debido a que, de forma general, la presencia de una sustancia antimicrobiana en un ambiente determinado en el que haya bacterias provoca la selección de variedades bacterianas resistentes a dicha sustancia, diversos estudios han descrito que el cultivo de bacterias en presencia de bacteriocinas puede provocar la aparición de mutantes resistentes a las mismas (Harris *et al.*, 1989; Ming y Daeschel, 1993; Mazotta y Montville, 1997; Kramer *et al.*, 2006). En este sentido, estudios realizados sobre la respuesta de varias cepas de *Ls. monocytogenes* a la presencia de PedPA-1 y NisA demostraron que: (i) de forma natural, existen cepas resistentes a cada una de las bacteriocinas; (ii) la influencia de los factores ambientales en la aparición de resistencias es específica de la bacteriocina, ya que las condiciones de estrés ambiental disminuyen la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a NisA, pero no influyen en la aparición de mutantes resistentes a PedPA-1; (iii) la estabilidad del fenotipo de resistencia varía considerablemente, siendo inestable en el caso de NisA, pero estable en el de PedPA-1; (iv) el coste metabólico que supone el fenotipo de resistencia, medido como una reducción en la tasa de crecimiento, también varía, siendo muy evidente en el caso de PedPA-1, y (v) las cepas mutantes resistentes no son más sensibles a las condiciones de estrés ambiental (Gravesen *et al.* 2002a; Chen y Hoover, 2003). No obstante, respecto a esta última característica, conviene mencionar que Modi *et al.* (2000) demostraron que las cepas mutantes resistentes a NisA son más sensibles a los tratamientos térmicos que las cepas salvajes.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para elucidar los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia a las bacteriocinas. En este sentido, la aparición de mutantes de *Listeria* spp. con bajos niveles de resistencia a bacteriocinas de la clase IIa se ha asociado con alteraciones en la composición lipídica, contenido de alanina (Ala) y carga de su membrana citoplasmática (Crandall y Montville, 1998; Vadyvaloo *et al.*, 2002, 2004a, b; Drider *et al.*, 2006). Por otra parte, la aparición de mutantes de *Ls. monocytogenes*, *E. faecalis* y lactococos con altos niveles de resistencia a bacteriocinas se debe principalmente a la pérdida del sistema PTS manosa-específico ($\text{EII}_t^{\text{Man}}$), codificado por el operón *mptACD*, que podría constituir el receptor de estas bacteriocinas (Dalet *et al.*, 2000, 2001; Héchard *et al.*, 2001; Gravesen *et al.*, 2002b, 2004; Ramnath *et al.*, 2004; Kjos *et al.*, 2011a). Asimismo, la aparición de mutantes de *Ls. monocytogenes* con altos niveles de resistencia también es el resultado de la pérdida del factor σ^{54} , codificado por el gen *rpoN* (Robichon *et al.*, 1997) y del activador ManR asociado a σ^{54} (Dalet *et al.*, 2001; Kjos *et al.*, 2011b), ambos implicados en la regulación positiva del operón *mpt* (Xue *et al.*, 2005; Kjos *et al.*, 2011b). Además, la aparición de mutantes con altos niveles de resistencia a bacteriocinas de la clase IIa también se ha asociado a la

sobreexpresión del sistema PTS glucósido β -específico (EII^{Bgl}) (Gravesen *et al.*, 2000, 2002b). Por otra parte, Diep *et al.* (2007) han demostrado que la pérdida de dos componentes de EII^{tMan} (*ptnC* y *ptnD*) en *L. lactis* IL1403, permite a esta cepa desarrollar resistencia frente a LcnA debido a que dichos componentes actúan como dianas celulares para esta bacteriocina, además de para otras bacteriocinas pertenecientes a la clase II (EntP, LcnB, PedPA-1 y SakA) (Diep *et al.*, 2007).

Recientemente, el empleo de la tecnología de *microarrays* de ADN para la caracterización de los mecanismos de resistencia a NisA en *L. lactis* ha revelado variaciones en la expresión de 95 genes diferentes pertenecientes a las siguientes categorías funcionales (Kramer, 2005; Kramer *et al.*, 2006): (i) síntesis de la pared celular; (ii) metabolismo central y energético; (iii) metabolismo de los fosfolípidos y los ácidos grasos; (iv) regulación génica; (v) transporte; (vi) respuesta a condiciones de estrés, y (vii) otras funciones desconocidas. Entre los genes sobreexpresados en estos mutantes destacan: (i) genes que codifican proteínas de unión a la penicilina; (ii) genes implicados en la síntesis de la pared celular, concretamente en sustituciones en el ácido lipoteicoico, cuya sobreexpresión provoca un incremento de la carga positiva de la pared celular; (iii) genes que codifican transportadores del tipo ABC (sección II.2.2.5.3.1) implicados en la resistencia a determinadas sustancias (*e.g.*, arsénico y bacitracina), y (iv) genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, particularmente en el catabolismo de la arginina (Arg), cuya sobreexpresión provoca un incremento de la producción de amonio y, por lo tanto, del pH de la pared celular, lo que podría incrementar su afinidad por NisA, impidiendo su acceso a la membrana citoplasmática. Por otra parte, se observó una reducción de la expresión de los genes implicados en la saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática. En definitiva, la resistencia a NisA en *L. lactis* y, probablemente, en otras bacterias Gram-positivas, es un rasgo multifactorial en el que están implicados simultáneamente numerosos mecanismos que parecen ser transitorios, ya que este fenotipo desaparece rápidamente cuando las cepas se desarrollan en un medio en ausencia de la bacteriocina (Kok *et al.*, 2005; Kramer, 2005; Kramer *et al.*, 2006).

Por otra parte, es conveniente destacar que se ha observado que tras el cultivo de determinadas cepas bacterianas en presencia de algunas bacteriocinas de la clase IIa, en ocasiones, se obtienen mutantes resistentes a esa bacteriocina que también son resistentes a otras bacteriocinas de la misma clase (*e.g.*, PedAcH/BavA, PedAcH/piscicolina 126 [Psc126], PedPA-1/divergicina M35 [DivM35] y leucocinas A [LeuA], B y E/SakA), lo que sugiere la existencia de un posible mecanismo general de resistencia a las bacteriocinas de la clase IIa (Rekhif *et al.*, 1994; Rasch y Knøchel, 1998; Bouttefroy y Milliere, 2000; Ramnath *et al.*, 2000; Gravesen *et al.*, 2002b; Ramnath *et al.*, 2004; Naghmouchi *et al.*, 2007). A pesar de que Gravesen *et al.* (2002a) han descrito el desarrollo de resistencia simultánea frente a NisA y PedPA-1 en una cepa de *Ls. monocytogenes* y diversos autores han observado la aparición de resistencias cruzadas frente a bacteriocinas de las clases I y II (Crandall y Montville, 1998; Bouttefroy y Milliere, 2000; Gravesen *et al.*, 2004; Naghmouchi *et al.*, 2007), en general, los

mutantes resistentes a bacteriocinas de la clase IIa no son resistentes a los lantibióticos ni a otras bacteriocinas pertenecientes a otras clases (Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997; Rasch y Knøchel, 1998; Guinane *et al.*, 2006). De manera similar, Drapper *et al.* (2009) demostraron que especies productoras de lantibióticos estrechamente relacionados (*e.g.* Ltn3147 y la estafilococcina C55, producida por *St. aureus*) pueden presentar inmunidad cruzada. Asimismo, estos investigadores demostraron la existencia de resistencias como consecuencia de la protección ejercida por genes de inmunidad frente a una bacteriocina presentes en cepas no productoras de la misma, como en el caso cepas de *Bacillus licheniformis* y *E. faecium* resistentes a Ltn3147. Estos resultados ponen de manifiesto el elevado riesgo de que aparezcan resistencias a los lantibióticos debidas a la posesión o adquisición de genes de inmunidad homólogos, por lo que estos fenómenos han de ser considerados ante un posible empleo de estos antimicrobianos en el ámbito clínico. Por otra parte, en el caso de NisA, se ha descrito un mecanismo de resistencia específico consistente en la degradación proteolítica de los seis últimos aminoácidos de su extremo C-terminal por la acción de la proteína NSR (del inglés *Nisin Resistance*), lo que resulta en una marcada disminución de la afinidad de la bacteriocina por la membrana plasmática así como de su potencia para formar poros en la misma (Sun *et al.*, 2009; Cotter *et al.*, 2013).

Finalmente, como estrategias para intentar paliar el problema de la aparición de poblaciones resistentes como consecuencia del empleo de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios o como alternativa a los antibióticos, se han propuesto las siguientes: (i) modificación de las bacteriocinas creando derivados de las mismas que sean capaces de unirse a sus receptores incluso en bacterias que hayan sufrido mutaciones; (ii) modificación de los péptidos para reducir su sensibilidad a las proteasas y (iii) empleo de combinaciones de bacteriocinas con una potente actividad antimicrobiana y con diferentes mecanismos de acción (Cotter *et al.*, 2013).

II.2.2.8.1. Resistencia cruzada con antibióticos

Como se ha mencionado anteriormente (sección II.2.2.7.1), las bacteriocinas podrían emplearse en el ámbito clínico como estrategia alternativa y/o complementaria a los antibióticos, lo que permitiría una reducción del empleo de los mismos y, como consecuencia, de la generación y desarrollo de microorganismos resistentes. Diversos estudios han demostrado la eficacia de algunas bacteriocinas frente microorganismos multirresistentes. A este respecto, la nisina y Ltn3147 inhiben el crecimiento de MRSA, VRE y neumococos resistentes a la penicilina (Severina *et al.*, 1998; Galvin *et al.*, 1999). Por otra parte, Brumfitt *et al.* (2002) observaron el efecto sinérgico entre la nisina y la ramiplanina, un lipoglicopéptido, frente a MRSA y VRE, lo que sugirió el uso potencial combinado de la nisina con inhibidores de la síntesis del peptidoglicano. Sin embargo, conviene destacar que, aunque la aparición de resistencias cruzadas entre bacteriocinas y antibióticos es poco probable, se han descrito algunos casos. Así, por ejemplo, Schmidt *et al.* (2010) describieron la adquisición inesperada de

resistencia a nisina y vancomicina tras la generación de cepas resistentes a la ramoplanina. Asimismo, un estudio realizado por Mehla y Sood (2011) revela la resistencia cruzada existente entre el antibiótico de origen fúngico alameticina y la pediocina, lo que se ha relacionado con el hecho de que ambos antimicrobianos coinciden en su mecanismo de acción. Por otra parte, también se ha descrito la existencia de bacterias resistentes a bacteriocinas con una mayor susceptibilidad a antibióticos. En este contexto, mutantes de *Ls. monocytogenes* resistentes a la nisina mostraron mayor sensibilidad a diferentes β -lactámicos, lo que se relacionó con cambios en la composición de la pared celular como consecuencia del aumento en la expresión de PBP (Gravesen *et al.*, 2001). Asimismo, un estudio elaborado por Martínez y Rodríguez (2005) reveló que cepas de *Ls. monocytogenes* resistentes a la nisina presentaron mayor sensibilidad a diversos antibióticos (*e.g.*, penicilina, ampicilina y eritromicina) que las cepas salvajes, mostrando únicamente resistencia cruzada con los aminoglucósidos kanamicina y estreptomicina, y la polimixina B.

II.2.2.9. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA

Como ya se ha mencionado anteriormente, a pesar del interesante potencial empleo de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, o de las correspondientes cepas bacteriocinogénicas, en las industrias farmacéutica y alimentaria, existen diversos factores que pueden limitar su utilidad, entre las que se incluyen las siguientes: (i) reducido espectro de acción antimicrobiana; (ii) bajo nivel de producción; (iii) bajo rendimiento de los protocolos para su purificación; (iv) falta de estabilidad/solubilidad en las condiciones ambientales necesarias (pH y temperatura); (v) obligatoriedad de emplear en los alimentos exclusivamente cepas bacteriocinogénicas consideradas como microorganismos GRAS y/o QPS; (vi) escasa adaptación de algunas cepas bacteriocinogénicas a los lugares de colonización; (vii) pérdida espontánea de la capacidad para producir bacteriocinas, y/o (viii) desarrollo de bacterias resistentes a las bacteriocinas. En este contexto, la producción de bacteriocinas por hospedadores heterólogos (no bacteriocinogénicos de forma natural) podría contribuir a paliar algunos de estos factores limitantes al permitir: (i) incrementar su producción; (ii) producirlas en hospedadores más seguros; (iii) obtener cepas productoras de varias bacteriocinas con un amplio espectro de acción antimicrobiana que puedan impedir el desarrollo de bacterias resistentes a las mismas, y (iv) dotar de una actividad antimicrobiana mayor o más específica a bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores, adjuntos y/o probióticos (Gutiérrez, 2005).

El diseño de un sistema eficiente para la producción heteróloga de proteínas o péptidos depende de numerosos factores, entre los que se incluyen las siguientes: (i) características del hospedador heterólogo; (ii) elementos genéticos utilizados (*i.e.*, vector de expresión, región promotora, lugar de unión al ribosoma y señales de transcripción y traducción); (iii) existencia de posibles modificaciones postraduccionales en la proteína de interés; (iv) nivel de expresión y la localización del producto final, y/o (v) posibles efectos tóxicos del producto final sobre el

hospedador (Makrides, 1996). Generalmente, los sistemas de producción heteróloga de proteínas se han basado en el empleo de *Ec. coli* como hospedador, debido a que es uno de los microorganismos mejor caracterizado genéticamente y para el que existen numerosas herramientas genéticas disponibles para su manipulación. Asimismo, las bacterias lácticas constituyen otra alternativa atractiva para la producción heteróloga de bacteriocinas, ya que, en su mayoría, se consideran microorganismos GRAS y/o QPS. Más concretamente, ciertas cepas de *L. lactis* se encuentran entre los hospedadores más adecuados ya que: (i) se ha secuenciado completamente su genoma; (ii) secretan un número muy reducido de proteínas; (iii) tienen escasa actividad proteolítica, y (iv) existen numerosas herramientas genéticas para su manipulación (Mierau *et al.*, 2005). Por otra parte, diversas especies de levaduras (*e.g.*, *Sc. cerevisiae* y *Pichia pastoris*) también resultan interesantes como hospedadores heterólogos para la producción de bacteriocinas ya que, aunque se les pueden aplicar las técnicas de manipulación genética de procariotas, gozan de la versatilidad de los sistemas eucariotas (Gutiérrez *et al.*, 2005a; Basanta *et al.*, 2009; 2010).

En un principio, la producción de bacteriocinas por hospedadores heterólogos se basó en la clonación de los genes responsables de su síntesis, transporte y procesamiento en diferentes vectores de expresión, lo que permitió, por ejemplo, la producción de PedPA-1 en *Ec. coli* (Marugg *et al.*, 1992) y *L. lactis* (Chikindas *et al.*, 1995a) y EntA en *E. faecalis* OG1X y *L. lactis* IL1403 (O’Keeffe *et al.*, 1999). No obstante, el hecho de que la mayoría de las bacteriocinas se sinteticen como precursores con una extensión N-terminal de elevada homología en su secuencia aminoacídica y con un lugar de procesamiento del tipo Gly-Gly permitió hipotetizar que las señales de transporte y procesamiento de las bacteriocinas podrían ser intercambiables. Esta hipótesis se demostró con la producción heteróloga de la lactacina F (LtaF) por *Leuconostoc gelidum* UAL187-22 empleando el sistema de procesamiento y secreción de LeuA (Allison *et al.*, 1995), de LcnA, con el sistema de procesamiento y secreción de LeuA (van Belkum y Stiles, 1995) y de MesY105 por *Lactobacillus johnsonii* NCK64 (Fremaux *et al.*, 1995). Por otra parte, Axelsson *et al.* (1998) desarrollaron un sistema de expresión que requería la utilización de dos plásmidos complementarios, uno con los genes necesarios para la inducción del promotor de SakA y los que intervienen en su procesamiento y secreción, y otro que contiene los genes estructurales y de inmunidad de la bacteriocina de interés bajo el control del promotor de SakA. Asimismo, el conocimiento de que la síntesis de NisA en *L. lactis* está regulada por un inductor (la propia NisA), que activa la transcripción de los genes involucrados en su síntesis y secreción, permitió el desarrollo de sistemas de expresión controlados por esta bacteriocina (sistema NICE, del inglés *NIsin Controlled Expression*). Estos sistemas han resultado de utilidad para la expresión de numerosas proteínas y péptidos en diferentes bacterias lácticas (Kleerebezem *et al.*, 1997b; Lin *et al.*, 1998; Mierau y Kleerebezem, 2005; Morello *et al.*, 2008; Borrero, 2012) y presentan un importante potencial para la producción de diversas bacteriocinas en otros hospedadores (Bryan *et al.*, 2000).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente (secciones II.2.2.1 y II.2.2.5.3.2), algunas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo SP, por lo que su transporte y procesamiento ocurre probablemente a través del sistema Sec en lugar de mediante un sistema DTS, como ya se ha demostrado para EntP (Herranz y Driessen, 2005). Por lo tanto, una alternativa de especial relevancia para la producción heteróloga de bacteriocinas consiste en el empleo de un sistema basado en la sustitución de la secuencia líder de la bacteriocina de interés por un SP de una bacteriocina u otras proteínas Sec-dependientes. A este respecto, se ha descrito la producción heteróloga de DivA, una bacteriocina Sec-dependiente de *C. divergens* (Worobo *et al.*, 1995), por cepas de *C. piscicola* y *L. lactis* transformadas con plásmidos que contenían únicamente el gen estructural y de inmunidad de dicha bacteriocina. Posteriormente, la transformación de *C. divergens*, *C. piscicola* y *L. lactis* con un vector de expresión que contenía la fusión entre el SP de DivA con la proteína madura de CbnB2 o de la colicina V (ColV) permitió la coproducción de ambas bacteriocinas en la misma cepa (McCormick *et al.*, 1996, 1998). Por otra parte, Gutiérrez *et al.* (2005a, b, c; 2006) utilizaron este sistema para la producción de la bacteriocina Sec-dependiente EntP de *E. faecium* P13 en *Ec. coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Pc. pastoris* y *L. lactis* subesp. *lactis* y *L. lactis* subesp. *cremoris*. Asimismo, se ha demostrado que la fusión de PedPA-1 de *P. acidilactici* PLBH9 y EntA de *E. faecium* PLBC21 con el SP de EntP es el único requisito necesario para la producción de estas bacteriocinas por cepas de *L. lactis*, así como para la coproducción de NisA/PedPA-1 y NisA/EntA por *L. lactis* subesp. *lactis* DPC5598 (NisA⁺) (Martín *et al.*, 2007a, b). De manera similar, Sánchez (2008) describió la construcción de vectores de expresión que contenían el gen estructural de la bacteriocina Sec-dependiente HirJM79 (*hirJM79*), con o sin su gen de inmunidad (*hiriJM79*), bajo el control de promotores constitutivos o inducibles, que permitieron la producción heteróloga de HirJM79 biológicamente activa en los sobrenadantes de *L. lactis* subesp. *lactis* IL1403, *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000, *Lb. sakei* Lb790 y *E. faecalis* JH2-2, así como la coproducción de HirJM79 y NisA por *L. lactis* subesp. *lactis* DPC5598, y de HirJM79 y EntP por *E. faecium* L50/14-2 (EntP⁺). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que las bacterias lácticas empleadas como hospedadores heterólogos eran capaces de producir mayores cantidades de HirJM79 que la cepa original. Finalmente, Borrero *et al.* (2011b) emplearon diversos SP para la producción de EntA por diversas cepas de bacterias lácticas y evaluaron la actividad antimicrobiana de las cepas recombinantes, obteniendo distintos resultados en función del vector de expresión, el péptido señal y la cepa hospedadora empleada.

Por otra parte, diversos estudios muestran la producción y expresión funcional de diversas bacteriocinas en levaduras. Así, por ejemplo, Gutiérrez *et al.*, 2005a describieron la clonación del gen de EntP madura (*entP*), producida por *E. faecium* P13 en el vector de expresión pPICZαA y su posterior transferencia a células competentes de *Pc. pastoris* X-33, lo que permitió la obtención de una mayor producción y actividad antimicrobiana de EntP por esta levadura en comparación con los resultados obtenidos para la cepa bacteriocinogénica salvaje.

Asimismo, la clonación del gen estructural de HirJM79 (*hirJM79*), producida por *E. hirae* DCH5, en el vector de expresión pPICZαA transferido a *Pc. pastoris* X-33TH, facilitó la producción y expresión funcional de HirJM79 por dicho hospedador. Sin embargo, aunque la producción de HirJM79 por *Pc. pastoris* X-33TH fue superior a la producción de la misma bacteriocina por *E. hirae* DCH5, su actividad antimicrobiana fue menor de lo deducido de su producción (Sánchez *et al.*, 2008). De forma similar, los genes estructurales de EntL50A (*entL50A*) y EntL50B (*entL50B*) se clonaron, independientemente y conjuntamente (*entL50AB*), en el vector pPICZαA para su expresión por *Pc. pastoris*, lo que permitió la secreción eficiente de ambos péptidos tanto de forma independiente como conjunta (Basanta *et al.*, 2010). Por otra parte, la clonación de los genes que codifican ambos péptidos antimicrobianos en vectores de expresión apropiados también permitió la producción y expresión funcional de EntL50A y EntL50B por células recombinantes de *Sc. cerevisiae* (Basanta *et al.*, 2009). Para ello, primero fue necesaria la construcción de un vector de expresión y secreción estable para *Sc. cerevisiae*, denominado pYABD01, por medio de la clonación del péptido señal del factor MFα1s en el vector de expresión de *Sc. cerevisiae*, denominado pYES2. Posteriormente, *entL50A* y *entL50B* se clonaron juntos y separados en dicho vector bajo el control del promotor del operon *Gall* (*PgalI*), inducible por galactosa y represible por glucosa, y los vectores resultantes se transfirieron a células competentes de *Sc. cerevisiae*. De esta manera, se obtuvieron levaduras recombinantes de *Sc. cerevisiae* productoras de EntL50A y EntL50B con actividad biológica. Conviene destacar que la producción eficiente de ambos péptidos por las levaduras *Pc. pastoris* y *Sc. cerevisiae* constituyó la primera descripción de la obtención y funcionalidad de levaduras recombinantes bacteriocinogénicas con capacidad de expresar y secretar heterológamente una bacteriocina no perteneciente a la familia de la pediocina (Basanta *et al.*, 2009; 2010).

Finalmente, la variabilidad de los resultados obtenidos en estos estudios pone de manifiesto la dificultad existente en la predicción de la eficacia de los modelos de producción heteróloga de bacteriocinas por las bacterias lácticas y levaduras, por lo que es necesario continuar realizando un esfuerzo investigador para la mejor comprensión de todos los aspectos que determinan la misma con el objetivo de lograr el máximo rendimiento de estos sistemas y, de este modo, un mejor aprovechamiento del potencial terapéutico y bioconservante de las bacterias lácticas y sus bacteriocinas en las industrias farmacéutica y alimentaria.

CAPÍTULO III

Streptococcus infantarius LP90: una cepa
bacteriocinogénica de origen lácteo con actividad
antineumocócica

CHAPTER III

Streptococcus infantarius LP90:
a bacteriocinogenic strain of dairy origin
with anti-pneumococcal activity

III.1. ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae infections are one of the major causes of morbidity and mortality worldwide. Currently, the treatment of these diseases represents a challenge because of the emergence of multidrug-resistance, mainly against β -lactam and macrolide antibiotics, amongst pneumococci. Although vaccination is a fundamental alternative to decrease the incidence of pneumococcal infections, it also presents some limitations, and thus researchers are urged to discover alternative strategies. In this context, ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins, referred to as bacteriocins, produced by Lactic Acid Bacteria (LAB) might constitute an alternative or complementary strategy to antibiotics in both human and veterinary medicine. In this work, we tested the antimicrobial activity of 38 bacteriocin-producing (*i.e.*, bacteriocinogenic) LAB, previously isolated from food and other sources, against clinical *S. pneumoniae* strains. The strain *Streptococcus* LP90, isolated from Venezuelan water-buffalo milk, was taxonomically identified as *S. infantarius* subsp. *infantarius* by polymerase chain reaction (PCR) amplification and DNA sequencing of an internal fragment of the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase (*sodA*) and selected for further studies because of its broad and strong anti-pneumococcal spectrum. The *in vitro* safety of *S. infantarius* LP90 was assayed by a comprehensive procedure comprising both phenotypic and genetic assays, including the detection of streptococcal and enterococcal virulence factors, the determination of its susceptibility to several antibiotics, and its ability to exert detrimental enzymatic activities such as degradation of mucin, deconjugation of bile salts, and production of biogenic amines. According to our results, *S. infantarius* LP90 may be considered as an avirulent strain not exerting potentially detrimental health effects. PCR analyses revealed that *S. infantarius* LP90 does not harbour any of the previously identified streptococcal and enterococcal bacteriocin structural genes. The bacteriocin responsible for the anti-pneumococcal activity exerted by *S. infantarius* LP90 was purified to homogeneity using a multi-chromatographic procedure including ammonium sulphate precipitation, gel filtration, and cation-exchange and reverse-phase liquid chromatographies in a Fast Protein Liquid Chromatography system (ÄKTA-FPLC). Analysis of the purified bacteriocin by a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry resulted in a single peak of 3,963Da. N-terminal amino acid sequencing of the purified bacteriocin by Edman-degradation allowed the identification of the first 19 amino acid residues of the molecule, revealing that it constitutes a novel non pediocin-like class II bacteriocin, which was termed infantaricin A (InfA). InfA, which is resistant to heat, a wide pH-range and proteolytic enzymes, is the first described and partially characterized bacteriocin produced by the species *S. infantarius*. Taken together, our results suggest that *S. infantarius* LP90 is a safe strain producing a novel bacteriocin displaying a broad and strong anti-pneumococcal spectrum and other interesting characteristics as an alternative or complementary strategy to antibiotics for the control of human infections caused by *S. pneumoniae*.

III.2. INTRODUCTION

Infections produced by *Streptococcus pneumoniae* (also referred to as Pneumococcus) are one of the major causes of morbidity and mortality worldwide, being the elderly and children the most commonly affected populations (Braido *et al.*, 2008; Rightmier *et al.*, 2011). Pneumococcus is one of the main aetiological agents of invasive diseases in humans, including sepsis and meningitis, being also the most frequent cause of clinical infections of the lower respiratory tract such as pneumonia, as well as of the upper respiratory tract, including sinusitis and acute otitis media (AOM) (Braido *et al.*, 2008; Rightmier *et al.*, 2011; Moffitt and Malley, 2011). Nevertheless, *S. pneumoniae* is an integral part of the commensal nasopharyngeal microbiota in some individuals, which would act as reservoirs for the transmission of this microorganism within the community (Cho *et al.*, 2012; Trappetti *et al.*, 2013). To date more than 90 pneumococcal serotypes differing in capsular polysaccharide structure have been described, but only 17 are responsible for an 80% of the clinical diseases. Although there is a link between serotypes and geographical region, age or the clinical syndromes occasioned (Hausdorff *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2011), the major epidemic clones worldwide, which are also linked most frequently to antibiotic resistance, belong to serotypes 6B, 14, 19F and 23F (Mokaddas *et al.*, 2008).

Nowadays, vaccination constitutes an interesting preventive strategy to lessen the burden of disease caused by *S. pneumoniae* (Van Bambeke *et al.*, 2007; De Wals *et al.*, 2009; Webster *et al.* 2011). Initially, two vaccines were developed: (i) the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23), composed of the capsular polysaccharides of serotypes most commonly causing disease, which induces an antibody response independent from T lymphocytes (Assaad *et al.*, 2012), and (ii) the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine (PCV7), composed of the capsular polysaccharides of the seven serotypes which are most frequently associated with antibiotic-resistance and invasive infections conjugated with a protein component of the diphtheria toxin, which produces a T-dependent response that confers immunological memory (Braido *et al.*, 2008). PPSV23, which has been in use for many years, is recommended for patients at high risk of invasive pneumococcal disease, including those asplenic, immunocompromised, or older than 65 years (Benninger and Manz, 2010). However, this vaccine is not effective in children younger than 2 years because of the immaturity of their immune system (Benninger and Manz, 2010). In this context, PCV7 was designed to be used in children of this age range. This vaccine has shown high efficacy in preventing invasive pneumococcal disease (IPD) caused by vaccine serotypes and had also been suggested to confer some cross-protection against other related serotypes. However, it has been observed that the incidence of disease caused by serotypes not included in the vaccines may increase as a consequence of their use (Barricarte *et al.*, 2007). Therefore, higher-valency polysaccharide conjugate vaccine formulations, namely a 10- and a 13-valent PCV (PCV10 and PCV13, respectively) have been recently introduced in children vaccination programs (Urueña *et al.*,

2011). These vaccines are intended to target the residual burden of IPD, non-invasive infections (pneumonia and AOM, especially complicated cases) and infections caused by non-PCV7 serotypes in children of up to 5 years (Weil-Olivier *et al.*, 2012). Nevertheless, it should be bear in mind that serotypes not included in the vaccines will remain a serious threat, as evidenced by the increasing number of infections caused by non-vaccine serotypes during the last years (Eskola *et al.*, 2001; Rodgers *et al.*, 2009; Schuerman *et al.*, 2009), and that the overall effectiveness of vaccination is influenced by the predominant serotypes in each geographic area (Barricarte *et al.*, 2007).

On the other hand, antibiotics are used as a therapeutic strategy for the control of pneumococcal infections (Van Bambeke *et al.*, 2007; Dockrell *et al.*, 2012); however, their widespread use has been associated with a global increase in antibacterial resistance and the emergence of multidrug-resistant (MDR) pneumococci (McGee *et al.*, 2001; Van Bambeke *et al.*, 2007). In this respect, *S. pneumoniae* shows acquired resistance mainly to β -lactams and macrolides; however, resistance against quinolones is also starting to emerge in countries in which there is an important consumption of these drugs. While β -lactams resistance is mediated by stepwise alterations of penicillin-binding proteins (PBPs), resulting in decreased affinity of PBP1a, PBP2x and PBP2b, macrolide resistance is usually caused by the presence of the *erm*(B) or the *mef*(A) resistance determinants, and resistance to quinolones is normally due to mutations in topoisomerases (Van Bambeke *et al.*, 2007). Although less frequent, resistance to other antibiotics, such as chloramphenicol, tetracycline, clindamycin, rifampicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole, have also been reported (McGee *et al.*, 2001).

In this scenario, when both vaccines and antibiotics are not enough to control the infections caused by *S. pneumoniae*, researchers are urged to discover other antimicrobial strategies based on novel modes of action (Montalbán-López *et al.*, 2011). With regard to this, bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria (LAB) may constitute an interesting alternative or complementary strategy to chemotherapy (Cotter *et al.*, 2013). Bacteriocins are ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins with activity against a wide variety of gram-positive bacteria and, to a lesser extent, gram-negative bacteria (Cintas *et al.*, 2001; Gálvez *et al.*, 2007; Cotter *et al.*, 2013). These molecules can be classified into three categories: (i) the lantibiotics, or post-translational modified peptides; (ii) the non-modified, small, heat-stable peptides, and (iii) the large, heat-labile protein bacteriocins. Class II bacteriocins may be further grouped into five subclasses: IIa (pediocin-like bacteriocins containing the N-terminal conserved motif YGNGVxC), IIb (two-peptide bacteriocins), IIc (leaderless bacteriocins), IId (circular bacteriocins), and IIe (other peptide bacteriocins) (Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; Nes *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2007). Amongst the features that make bacteriocins an advantageous alternative to antibiotics are the following: (i) effectiveness at picomolar to nanomolar concentrations; (ii) ability to avoid the growth of pathogenic microorganisms with no or little effect on the commensal microbiota (narrow- spectrum peptides); (iii) possibility of *in situ* production by probiotics, and (iv) feasibility to be

bioengineered (Riley and Wertz, 2002; Papagianni *et al.*, 2003; Rea *et al.*, 2011; Cotter *et al.*, 2013). Moreover, the use of bacteriocins might allow a reduction in the use of antibiotics which in turn would result in a decrease of selection for resistance (Riley and Wertz, 2002). It should be also mentioned that cross-resistance to antibiotics and bacteriocins is very unlikely, and in fact many studies demonstrate the effectiveness of bacteriocins to fight against antibiotic resistant and MDR bacteria such as *S. pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, as well as vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* (Severina *et al.*, 1998; Galvin *et al.*, 1999; Brumfitt *et al.*, 2002). On the other hand, some bacteriocin-resistant bacteria show an increase of sensitivity to antibiotics (Gravesen *et al.*, 2001).

The potential use of bacteriocins to address human and animal health concerns has been previously addressed. In this regard, the lantibiotic nisin A (NisA), produced by several strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, has a great potential for treating peptic ulcer disease by inhibition of *Helicobacter pylori* (Kim *et al.*, 2003; Piper *et al.*, 2009a), being also active against *Clostridium difficile*, which causes antibiotic-associated enterocolitis (Cotter *et al.*, 2005a; Piper *et al.*, 2009a). Interestingly, the antimicrobial activity of NisA against MDR *S. pneumoniae* has been demonstrated both *in vitro* and in a mouse infection model (Goldstein *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 2009a). On the other hand, salivaricins A and B, produced by *Streptococcus salivarius* 20P3 and *S. salivarius* K12, respectively, have been shown as effective antimicrobials for the treatment of upper respiratory tract infections caused by streptococci, including *Streptococcus pyogenes*, responsible for sore throat, and *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, both involved in dental caries. Likewise, salivaricin B can also be used in the treatment of halitosis or bad breath caused by *Prevotella* spp., *Eubacterium saburreum* and *Micromonas micros* (Tagg *et al.*, 2004; Chilcott and Tagg, 2005; Tagg *et al.*, 2006; Gillor and Ghazaryan, 2007). Concerning the treatment of animal infections, lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic produced by *L. lactis* DPC3147 is active against streptococci and staphylococci responsible for bovine mastitis (Ryan *et al.*, 1998). Moreover, lactocin LWP320 and enterocin LWP21, produced by *Lactobacillus acidophilus* LWP320 and *Enterococcus faecalis* LWP21, respectively, may be considered as promising agents for prevention of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. contamination in poultry (Stern *et al.*, 2005; Gillor and Ghazaryan, 2007).

This work describes for the first time the identification and partial characterization of a bacteriocin produced by the species *Streptococcus infantarius*. The bacteriocin, termed infantaricin A (InfA), is a novel anti-pneumococcal non pediocin-like class II bacteriocin produced by *S. infantarius* subsp. *infantarius* LP90, a non-virulent strain of dairy origin, which could be used as an alternative or complementary strategy to antibiotics for the treatment of human infections caused by *S. pneumoniae*, for which vaccination and antibiotic programs may be non fully effective.

III.3. MATERIALS AND METHODS

III.3.1. Bacterial strains, growth media and culture conditions

The sources and relevant characteristics of the bacteriocinogenic LAB and clinical *S. pneumoniae* strains used as indicator microorganisms are listed in Table III.1. Unless otherwise stated, LAB were grown aerobically in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 30 °C for 16 h. *S. pneumoniae* colonies were obtained by inoculation on Columbia agar supplemented with horse blood (5%, w/v) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) after incubation under aerobic conditions at 37 °C overnight. Subsequently, a loop of bacterial mass taken from the surface of these plates was transferred to Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid), and cultures were incubated under aerobic conditions at 37 °C for approximately 6 h (OD₆₀₀ of 0.5).

III.3.2. Antimicrobial activity assays

The direct antimicrobial activity of 38 bacteriocinogenic LAB was first screened by a stab-on-agar test (SOAT) as previously described (Cintas *et al.*, 1995), using 9 *S. pneumoniae* strains (Table III.5) as indicator microorganisms. Briefly, the bacteriocinogenic strains were stabbed onto MRS agar (1.5% w/v) and incubated at 30 °C for 5 h, and then 40 ml of BHI soft (0.8%, w/v) agar (Oxoid) containing about 1×10^5 cfu/ml of the indicator strain was poured over the plates. After incubation, at 37 °C for 12 h, the plates were checked for inhibition zones around the colonies. Antimicrobial activity was quantified by measuring the diameter of the inhibition halo (mm), considering as positive results only diameters higher than 3 mm. Subsequently, the cell-free culture supernatants (CFS) from the 38 bacteriocinogenic LAB grown in MRS broth at 30 °C until the stationary phase (OD₆₀₀ of *ca.* 1.0) were obtained by centrifugation at $12,000 \times g$ at 4 °C for 10 min. After adjusting their pH to 6.2 with 1M NaOH, they were filter-sterilized through 0.22 µm-pore-size filters (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA), and stored at -20 °C until use. The anti-pneumococcal activity of the 38 CFS was determined by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.* 1995) against 23 pneumococcal strains (Table III.5). For this purpose, BHI soft agar (80 ml) were inoculated with approximately 1×10^5 cfu/ml of the *S. pneumoniae* indicator strains (Table III.1), and poured into a Petri dish. After cooling, wells (6-mm diameter) were made in the agar, and 50 µl of CFS were added. After incubation of the plates at 37 °C for 12 h, the antimicrobial activity was quantified by measuring the diameter (mm) of the inhibition zones around the wells, and the bacteriocinogenic strains showing the highest antimicrobial activity were selected for further evaluation. In order to determine the growth conditions leading to maximum bacteriocin activity, the selected bacteriocinogenic LAB were grown in MRS broth at 30 and 37 °C for 16 h. CFSs from these cultures obtained at 6, 10, 12, and 16 h were tested for antimicrobial activity against *S. pneumoniae* FQ26, *S. pneumoniae* FQ30, *S. pneumoniae* FQ33, *S. pneumoniae* FQ39, *S. pneumoniae* 52084, *S. pneumoniae* 67620

Table III.1. Bacteriocinogenic LAB and indicator microorganisms used in this study.

Microorganisms	Strains	Relevant characteristics ^a	Source or reference ^b
Bacteriocinogenic strains		Bacteriocin(s) produced	
<i>Enterococcus faecium</i>	L50	EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP and EntQ	Cintas <i>et al.</i> (1995) Cintas <i>et al.</i> (1998) Cintas <i>et al.</i> (2000)
<i>E. faecium</i>	QA54	EntL50 (EntL50A and EntL50B)	Citti (2005)
<i>E. faecium</i>	QF387	EntP	Citti (2005)
<i>E. faecium</i>	P13	EntP	Cintas <i>et al.</i> (1997)
<i>E. faecium</i>	T136	EntA and EntB	Casaus <i>et al.</i> (1997)
<i>E. faecium</i>	CV1	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	CV2	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	TPP2	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	TPM76	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	LPP29	Nd	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	SMA7	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	SMA8	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	SM10	Nd	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	SMA36	HirJM79	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	SMF8	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	BNM58	EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP and EntQ	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	CGM17	EntL50 (EntL50A and EntL50B)	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	BCS59	EntP	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	BCS97	EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP and EntQ	Gómez-Sala (2013)
<i>E. faecium</i>	DEC7	EntA and EntB	Sánchez <i>et al.</i> (2007)
<i>E. faecium</i>	DCH37	EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP and EntQ	Sánchez <i>et al.</i> (2007)
<i>E. faecium</i>	DCH38	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Sánchez <i>et al.</i> (2007)
<i>E. faecium</i>	HS38	EntP	Brandao <i>et al.</i> (2010)
<i>Enterococcus faecalis</i>	DBH18	EntL50 (EntL50A and EntL50B)	Sánchez <i>et al.</i> (2007)
<i>E. faecalis</i>	PB1	EntL50 (EntL50A and EntL50B)	Clinical origin
<i>E. faecalis</i>	DBH9	EntA	Sánchez <i>et al.</i> (2007)
<i>Enterococcus hirae</i>	DCH5	HirJM79	Sánchez <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB24	NisA	Cintas <i>et al.</i> (1998)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	QA13	Nd	Citti (2005)
<i>Lactococcus garvieae</i>	DCC43	GarML	Sánchez <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	B11	Nd	Gómez-Sala (2013)
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	SMA17	Nd	Gómez-Sala (2013)
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	SMM73	Nd	Gómez-Sala (2013)
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	BCS35	SakP, CurG14, CurG15	Gómez-Sala (2013)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	347	PedPA-1	Moreira <i>et al.</i> (1993)
<i>P. acidilactici</i>	QF154	PedPA-1	Citti (2005)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LPV57	Nd	Gómez-Sala (2013)
<i>Streptococcus</i> sp.	LP90	Nd	Citti (2005)
Indicator strains		Strain serotype and antibiotic susceptibility pattern	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	FQ6	23F; Pen ^R , Ctx ^I , Ery ^R , Cla ^R , Cli ^R , Tet ^R , Sxt ^R , Chl ^R	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ11	23F; Pen ^R , Ctx ^S , Ery ^R , Cla ^R , Cli ^R , Tet ^R , Sxt ^R , Chl ^R	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ21	23F; Pen ^R , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^R , Sxt ^R , Chl ^R	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ26	3; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ27	19A; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^R , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ30	19A; Pen ^R , Ctx ^S , Ery ^R , Cla ^R , Cli ^S , Tet ^R , Sxt ^R , Chl ^R	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ32	19A; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^R , Sxt ^R , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ33	23F; Pen ^R , Ctx ^I , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^R , Sxt ^R , Chl ^R	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ36	6A; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ39	6B; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^R	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ40	19F; Pen ^I , Ctx ^S , Ery ^R , Cla ^R , Cli ^R , Tet ^R , Sxt ^I , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	FQ54	Nd; Pen ^I , Ctx ^I , Ery ^R , Cla ^R , Cli ^S , Tet ^R , Sxt ^R , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	49083	19A; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	49781	7A; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	52084	19V; Pen ^R , Ctx ^R , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	66405	19F; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	67620	19A; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^R , Cla ^R , Cli ^R , Tet ^R , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	70423	24F; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	99828	22F; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	111692	8; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^R , Cla ^R , Cli ^R , Tet ^R , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	121404	18F; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	121411	19F; Pen ^S , Ctx ^S , Ery ^S , Cla ^S , Cli ^S , Tet ^S , Sxt ^S , Chl ^S	Human clinical sample
<i>S. pneumoniae</i>	15M-1047	Nd	Human clinical sample

^aAbbreviations: EntL50 (EntL50A and EntL50B), enterocin L50 (L50A and L50B); EntP, enterocin P; EntQ, enterocin Q; EntA, enterocin A; EntB, enterocin B; HirJM79, hiracin JM79; EntLA, enterolysin A; NisA, nisin A; GarML, garvicin ML; SakP, sakacin P; CurG14, curvacin G14; CurG15, curvacin G15; Ped PA-1, pediocin PA-1; Pen, penicillin; Ctx, cefotaxime; Ery, erythromycin; Cla, claritromycin; Cli, clindamycin; Chl, chloramphenicol; Tet, tetracycline; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; S, susceptibility; I, intermediate susceptibility/resistance; R, resistance; Nd, not determined. ^bClinical origin, Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal (Madrid, Spain).

and *S. pneumoniae* 15M-1047 by an ADT. The CFSs showing the highest antimicrobial activity from each LAB were further challenged against the same pneumococcal strains by a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000). In the MPA, each well of the microtiter plate contained 50 µl of two-fold serial dilutions (in BHI broth) of CFS and 150 µl of a diluted (in BHI broth) fresh overnight culture of the indicator microorganism (approx., 4×10^5 cfu/ml). After aerobic incubation of the plates at 37 °C for 12 h, growth inhibition was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtiter plate reader (Labsystems iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the highest dilution of the CFS causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin).

III.3.3. Taxonomic identification of *Streptococcus* sp. LP90

The strain *Streptococcus* sp. LP90 was taxonomically identified by DNA sequencing of an internal fragment of the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase (*sodA*) amplified by the polymerase chain reaction (PCR) according to the procedure described by Poyart *et al.* (1998). Unless otherwise stated, total DNA purified with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) was used as target for PCR amplifications carried out in 50 µl reaction mixtures containing 300-500 ng of DNA, 70 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), and 1U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California). Oligonucleotide primers used in this study, *d1* (5'-CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC-3') and *d2* (5'-ARRTARTAI GCRTGYTCCCAIACRTC-3'), were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, United Kingdom). Reactions without template DNA were set up as negative controls. PCR mixtures were subjected to thermal cycling under the following conditions: initial denaturation (97 °C for 3 min) followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 30 sec), annealing (50 °C for 2 min), elongation (72 °C for 1 min 30 sec) and a final 12-min extension at 72 °C, in an Eppendorf Mastercycler DNA thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplified PCR products were resolved by electrophoresis through agarose (2%, w/v) (Pronadisa, Madrid, Spain) gels stained with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA), and analyzed with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). The molecular size marker used was HyperLadder II (Bioline London, United Kingdom). The PCR products were purified using the NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Service of Parque Científico-UCM (Madrid, Spain). The nucleotide BLAST software (NCBI [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome]) was used for nucleotide similarity search.

III.3.4. Influence of growth media and incubation conditions on bacterial growth, culture-pH and anti-pneumococcal activity of *S. infantarius* LP90

In order to evaluate the influence of growth media and incubation conditions on bacterial growth, culture-pH and anti-pneumococcal activity of *S. infantarius* LP90, this strain was grown in MRS broth (pH 6.2) and GM17 broth (M17 broth [Oxoid] supplemented with glucose [0.5%, w/v] [Merck, Farma y Química S. A., Barcelona, Spain]; pH 6.9) at 37 °C under aerobic and anaerobic conditions, and in BHI broth (pH 7.4), Tryptone Soya Broth (TSB, pH 7.3) and Todd-Hewitt Broth (THB, pH 7.8) (both from Oxoid) at 37 °C under aerobic conditions. Bacterial growth (OD₆₀₀), culture-pH and bacteriocin activity of CFSs obtained at 10, 12, 14, 16 and 18 h were determined periodically in duplicate. For determination of bacteriocin activity, the CFSs were assayed by an MPA using *S. pneumoniae* FQ30 as indicator microorganism.

III.3.5. Physicochemical stability of the anti-pneumococcal compound secreted by *S. infantarius* LP90

To determine the physicochemical stability of the anti-pneumococcal compound secreted by *S. infantarius* LP90, aliquots of CFSs were subjected to heat, pH and enzymatic treatments. After the treatments, residual antimicrobial activity (%) was detected by an ADT and calculated by an MPA using *S. pneumoniae* 66405 as indicator microorganism.

III.3.5.1. Sensitivity to heat

CFS obtained from *S. infantarius* LP90 cultures adjusted to pH 6.2 were heated at 100 °C for 10, 30 and 60 min, and subsequently chilled on ice. A non-treated CFS kept on ice was used as a positive control for antimicrobial activity. The residual anti-pneumococcal activity was calculated by dividing the antimicrobial activity of treated CFS by that of the control sample (without heat treatment) and expressed in percentage (%).

III.3.5.2. Sensitivity to pH

CFSs obtained from *S. infantarius* LP90 cultures (approx. pH 4.4) were adjusted to pH 5.0, 6.2 and 8.0 with 0.1 and 1M NaOH. CFS adjusted to pH 6.2 and aliquots of MRS broth adjusted to pH 4.4, 5.0 and 8.0 were used as positive and negative controls of antimicrobial activity, respectively. Samples were sterilized through 0.22µm-pore-size filters and incubated at 4 °C for 24 h. The residual anti-pneumococcal activity was calculated by dividing the antimicrobial activity of treated CFS by that of the positive control sample (supernatant at pH 6.2) and expressed in percentage (%).

III.3.5.3. Sensitivity to proteolytic, lipolytic and glycolytic enzymes

The enzymatic sensitivity of the anti-pneumococcal compound secreted by *S. infantarius* LP90 was determined using proteolytic (proteinase K [5 mg/ml] and pepsin [5 mg/ml]),

lipolytic (lipase [5 mg/ml]) and glycolytic (amylase [5 mg/ml]) enzymes (Sigma-Aldrich, Corporation, St. Louis, Missouri, USA). All the enzymes were resuspended in 20 mM phosphate buffer (pH 6.5), except pepsin, which was dissolved in the same buffer adjusted to pH 2.0. CFSs obtained from *S. infantarius* LP90 cultures (approx. pH 4.4) were adjusted to pH 6.2 with 1M NaOH, except those destined to treatment with pepsin, which were adjusted to pH 2.0 with 1M HCl. CFSs adjusted to pH 6.2 and 2.0 and aliquots of MRS broth containing the enzymes at 5 mg/ml were used as positive and negative controls of antimicrobial activity, respectively. Samples were sterilized through 0.22µm-pore-size filters and incubated at 37 °C for 2 h. After treatment, the samples were heated at 100 °C for 10 min to denature the enzymes and then chilled on ice. The residual anti-pneumococcal activity was calculated by dividing the antimicrobial activity of the treated CFSs by that of the positive control samples (with no added enzymes) and expressed in percentage (%).

III.3.6. Safety assessment of *S. infantarius* LP90

III.3.6.1. Antimicrobial susceptibility testing

The minimum inhibitory concentration (MIC) of 16 antibiotics against *S. infantarius* LP90 was determined by a broth microdilution test using Lact-1 and Lact-2 VetMIC microplates (National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden). The antibiotics evaluated were ampicillin, penicillin, vancomycin, erythromycin, virginiamycin, tetracycline, clindamycin, chloramphenicol, kanamycin, gentamycin, streptomycin, neomycin, linezolid, rifampicin, ciprofloxacin, and trimethoprim. Individual colonies of *S. infantarius* LP90 were suspended in a sterile glass tube containing 5 ml of saline solution (0.85% NaCl, w/v) to a turbidity of 1 in the McFarland scale (approx., 3×10^8 cfu/ml) and further diluted 1,000-fold. Susceptibility test medium (LSM medium) (Iso-Sensitest [IST]: MRS, 9:1) (Oxoid) was used. Then, 100 µl of the diluted *S. infantarius* LP90 suspension was added to each microplate well, which was sealed with a transparent covering tape and incubated at 37 °C for 18 h. After incubation, MICs were defined as the lowest concentration of the antibiotic that inhibited bacterial growth. Due to the lack of breakpoints for *S. infantarius*, most of the results were interpreted according to the breakpoints proposed for *Streptococcus thermophilus* by the EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) in relation to the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance (EFSA, 2012). *S. thermophilus* CECT801 was used as control.

III.3.6.2. Detection of virulence factors

III.3.6.2.1. Phenotypic detection of virulence factors

Production of gelatinase, β-hemolysin and protease activity were determined on Todd Hewitt agar containing gelatine (3%, w/v) (Oxoid), Columbia agar supplemented with horse blood (5%, w/v), and Tryptone Soya agar (TSA) supplemented with skim milk (1.5%, w/v)

(Oxoid), respectively. *E. faecalis* P4 and *E. faecalis* P36 (Eaton and Gasson, 2001) were used as positive controls for virulence factors. *S. infantarius* LP90 was grown in MRS broth at 37 °C in aerobic conditions for 16 h and then inoculated into MRS agar to obtain single colonies that were streaked onto the culture media cited above. After incubation at 37 °C for 24 h, the plates containing gelatine were placed at 4 °C for 5 h to facilitate the detection of zones of turbidity (indicating gelatine hydrolysis) around the colonies. The production of β -hemolysin and protease activity was detected by the presence of clear zones around the colonies on the Columbia agar and TSA plates, respectively.

III.3.6.2.2. PCR-detection of genes encoding virulence factors

The presence of streptococcal and enterococcal virulence factor genes in *S. infantarius* LP90 was determined by PCR using the primer pairs listed in Table III.2. PCR amplifications were carried out in 25 μ l reaction mixtures containing 150-250 ng of total DNA, 35 pmol of each primer, 0.2mM of each dNTP, and 0.75U of Platinum *Taq* DNA polymerase. PCR mixtures were subjected to an initial cycle of denaturation (97 °C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 45 sec), annealing (at an appropriate temperature [Table III.2] for 30 sec), and elongation (72 °C for 30 to 180 s), ending with a final extension step at 72 °C for 7 min in an Eppendorf Mastercycler DNA thermal cycler. PCR products were resolved and analyzed as described above. The molecular size markers used were HyperLadder II and 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

III.3.6.3. Biogenic amine production

III.3.6.3.1. Differential growth medium for the screening of histidine, tyrosine and ornithine decarboxylase activities

The presence of histidine, tyrosine and ornithine decarboxylase activities (HDC, TDC and ODC, respectively) in *S. infantarius* LP90 was evaluated using the improved decarboxylase differential growth medium (from this point, plate assay) described by Bover-Cid and Holzapfel (1999), which contains the following ingredients: tryptone (0.5%, w/v) (Sigma), yeast extract (0.5%, w/v) (Pronadisa), meat extract (0.5%, w/v) (Merck), sodium chloride (0.25%, w/v) (Merck), glucose (0.05%, w/v) (Panreac Química S. A., Barcelona, Spain), Tween 80 (0.1%, w/v) (Panreac), MgSO₄ (0.02%, w/v) (Merck), MnSO₄ (0.005%, w/v) (Merck), FeSO₄ (0.004%, w/v) (Panreac), ammonium citrate (0.2%, w/v) (Merck), thiamine (0.001%, w/v) (Fluka, Sigma-Aldrich), K₂PO₄ (0.2%, w/v) (Merck), CaCO₃ (0.01%, w/v) (Fluka, Sigma-Aldrich), piridoxal-5-phosphate (0.005%, w/v) (Sigma-Aldrich), amino acid (1%, w/v), bromocresol purple (0.006%, w/v) (Sigma-Aldrich), and agar (2%, w/v) (Pronadisa) adjusted to pH 5.3. *S. infantarius* LP90 was subcultured 5 times in MRS broth containing 0.1% (w/v) of the corresponding amino acid precursor (histamine, tyrosine or ornithine to check for HDC, TDC and ODC activities, respectively) (Sigma-Aldrich) and 0.005% (w/v) of pyridoxal-5-phosphate at 30 °C overnight in order to promote the corresponding enzyme induction. Subsequently, cultures were streaked in

Table III.2. Primers and PCR conditions for detection of virulence factor genes.

Virulence factors	Genes	Primer pairs	Primer sequence (5'-3') ^a	T _m		Strains used as PCR positive controls	Primer reference
				(°C)	Product size (bp)		
Streptococcal virulence factors							
C5a peptidase	spcA	scpAF	CGGTTATCATGGGACTGTGTG	52.0	1,250	S. pyogenes LMG21599	Burton <i>et al.</i> (2006)
		scpAR	TTGCCGATGTCGACTTC				
Glucosyltransferase	gtf	gtfF	GAACTGTTGATGCTATTGACAGC	50.0	678	S. infantarius ^b	Hoshino <i>et al.</i> (2005)
		gtfR	CATTGACATTATCCACCGATCGACAG				
Hyaluronan synthase	hasA	hasAF	GTGTGTTAGCACAGACCTATCC	50.0	720	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		hasAR	CTTCGAAAATAGTCCATAAGGC				
Hyaluronate lyase (chromosomally encoded)	hlyA	hlyAF	ATGAAATTGGAACTCTCTGTGC	50.0	500	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		hlyAR	CGAGTCATATCCATCATTTCTCC				
Hyaluronate lyase (bacteriophage encoded)	hlyP2	hlyP2F	GCTACGAGTCCAAATTTAAGCGG	50.0	400	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		hlyP2R	GTATACATCACCATAGACGACC				
M-protein	emm	emmF	TATTSGCTTAGAAAAATTAA	50.0	1,200	S. pyogenes LMG21599	Burton <i>et al.</i> (2006)
		emmR	GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT				
Pyrogenic exotoxin (SmeZ2)	smeZ2	smeZ2F	GGACGAATATGCAGCCAATGA	50.0	330	S. pyogenes LMG21599	Burton <i>et al.</i> (2006)
		smeZ2R	GTATGAAAAACCAAGTCTACCA				
Pyrogenic exotoxin (SpeB)	speB	speBF	TGACGCTAACGGTAAAGAAACA	52.0	800	S. pyogenes LMG21599	Burton <i>et al.</i> (2006)
		speBR	GCCGCCACCACTACCAAGAGC				
Pyrogenic exotoxin (SpeF)	speF	speFF	GCTCTTGATCAGCCACAAATGCG	50.0	450	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		speFR	GCATCTCCACCGAGACTATCTGC				
Pyrogenic exotoxin (SpeG)	speG	speGF	CTATGGAAAGTCAATTAGCTTATGC	50.0	500	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		speGR	CCGATGTATAACGCGATTCCG				
Pyrogenic exotoxin (SpeJ)	speJ	speJF	AATAATCTTTCATGGGTACGGAAG	52.0	500	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		speJR	TTGATCGCAATTCTAAATGGCC				
Streptokinase	ska	skaF	CGATCTAACATCAACAACCTGC	50.0	460	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		skaR	GATGTGATGGTGTACCGATAGC				
Streptolysin O	slo	sloF	CTGGGCTACTGACGCGCAGC	50.0	900	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		sloR	CGGAGCTTCATGCTGACACC				
Streptolysin S	sagAB	sagAF	ATTGAGCTAGCCTGTCTCTTGT	52.0	1,150	S. pyogenes LMG21599	Burton <i>et al.</i> (2006)
		sagAR	GTATTCGCAAAATCTCTAACG				
Virulence factors regulator Mga	mga	mgaF	CATGCAATTATGAAGGAAGTGCG	50.0	500	S. pyogenes LMG21599	Maragkoudakis <i>et al.</i> (2009)
		mgaR	TGTCGTAGACGGCAGAGTGTC				
Enterococcal virulence factors							
Aggregation protein	agg	TE3	AAGAAAAAGAGTAGACCAAC	52.0	1,553	E. faecalis P4	Eaton and Gasson (2001)
		TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA				
Cytolysin	cyt _L L _M	RHCT1	GTACTAACAGAGAGTGC	48.5	2,659	E. faecalis P4	Hickey <i>et al.</i> (2003)
		RHCT2	TAGGCATCTATTACAGAGC				
Cytolysin precursor	cyt _L L _S	cyLLSR1	GTGTTGAGGAAATGGAAGCG	60.0	324	E. faecalis P4	Gilmore <i>et al.</i> (1994)
		cyLLSR2	TCTCAGCCTGAACATCTCCAC				
E. faecalis cell wall adhesion protein	efadA/s	TE5	GACAGACCTCACAATA	49.0	705	E. faecalis GM26	Eaton and Gasson (2001)
		TE6	AGTTCATCATGCTGTAGTA				
Enterococcal surface protein	esp	TE34	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	64.0	933	E. faecalis P36	Eaton and Gasson (2001)
		TE36	GCGTCAACACTTGCAATGCCGAA				
Gelatinase	gelE	TE9	ACCCGATCAATGGTTT	57.5	419	E. faecalis P4	Eaton and Gasson (2001)
		TE10	ACGCAATTGCTTTTCCATC				
Hyaluronidase	hyl	HYLn1	ACAGAAGAGCTCAGGAAATG	58.0	276	E. faecium C68	Vankerckhoven <i>et al.</i> (2004)
		HYLn2	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA				

^aDegenerate base symbols, S (C or G); ^bDepartment of Food Science, Food Microbiology, Centre for Advanced Food Studies (LMC), Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

duplicate on decarboxylase differential growth medium agar plates with or without (negative control) the corresponding amino acid precursor, and incubated at 37 °C for 4 days under aerobic and anaerobic conditions. Biogenic amine production was detected by a yellow to violet color change in the decarboxylase medium due to the alkalization produced by the decarboxylation of the corresponding amino acid precursor. *Lactobacillus brevis* CECT4121 was used as positive control for tyramine production, and as negative control for histamine and putrescine production. Likewise, *Lactobacillus* sp. ATCC30a was used as positive control for histamine and putrescine production, and as negative control for tyramine production (García-Moruno *et al.*, 2005; Muñoz-Atienza *et al.*, 2011).

III.3.6.3.2. PCR-detection of *HDC*, *TDC* and *ODC* genes

Total DNA from *S. infantarius* LP90 was subjected to PCR-amplifications to detect the presence of the *HDC*, *TDC* and *ODC* genes (*hdc*, *tdc* and *odc*, respectively) by using the primers shown in Table III.3. *Lb. brevis* CECT4121 was used as positive control for *tdc*-, and as negative control for *hdc*- and *odc*-PCR-amplification. Likewise, *Lactobacillus* sp. ATCC30a was used as positive control for *hdc*- and *odc*-, and as negative control for *tdc*-PCR-amplification. PCR mixtures prepared as described above were subjected to an initial cycle of denaturation (94-97 °C for 2 to 4 min), followed by 35 cycles of denaturation (94-95 °C for 45 to 60 s), annealing (48-52 °C for 30 sec), and elongation (72 °C for 60 to 180 s), ending with a final extension step at 72 °C for 7 min in an Eppendorf Mastercycler DNA thermal cycler. PCR products were resolved and analyzed as described above. The molecular size markers used were HyperLadder II and 1Kb Plus DNA ladder.

Table III.3. Primers and PCR conditions for detection of *HDC*, *TDC* and *ODC* genes.

Enzymatic activity	Gene	Pairs of primers	Primer sequence (5'-3') ^a	T _m (°C)	Product size (bp)	Strains used as PCR positive control	References
Histidine decarboxylase	<i>hdc</i>	CL1 JV17HC	CCWGGWAAWATWGGWAATGGWTA AGACCATAACCATAACCTT	48	458	<i>Lactobacillus brevis</i> CECT4121	Le jeune <i>et al.</i> (1995)
Tyrosine decarboxylase	<i>tdc</i>	TD2 TD5	ACATAGTCAACCATRTTGAA CAAATGGAAGAAGAAGTAGG	48	1,100	<i>Lactobacillus</i> sp. ATCC30a	Coton <i>et al.</i> (2004)
Ornithine decarboxylase	<i>odc</i>	3 16	GTNTTYAAYGCNGAYAAACNTAYTTYGT TACRCARAATACTCCNGGNGGRTANGG	52	1,446	<i>Lactobacillus</i> sp. ATCC30a	Marcobal <i>et al.</i> (2005)

^aDegenerate base symbols: K (G or T), R (A or G), W (A or T), Y (C or T), S (C or G), M (A or C), D (A, G or T), N (A, G, C or T).

III.3.6.4. Determination of enzymatic activities

The APIZYM kit (BioMérieux) was used to determine the presence of the following enzymatic activities in *S. infantarius* LP90: esterase (C4), esterase lipase (C8), trypsin, α -chymotrypsin, leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI phosphohydrolase, alkaline phosphatase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, and α -fucosidase. Cells from an overnight *S. infantarius* LP90 culture were harvested by centrifugation at 12,000 $\times g$ for 2 min, resuspended in 2 ml of API Suspension Medium (BioMérieux) and adjusted to a turbidity of 5-6 in the McFarland scale (approx., 1.5-

1.9×10⁹ cfu/ml). Aliquots of 65 µl of the suspensions were added to each of the 20 reaction cupules in the APIZYM strip. The strips were incubated at 37 °C for 4.5 h and the reactions were developed by the addition of one drop of each of the APIZYM reagents A and B. Enzymatic activities were graded from 0 to 5, and converted to nanomoles as indicated by the manufacturer.

III.3.6.5. Degradation of mucin

The ability of *S. infantarius* LP90 to degrade gastric mucin was determined as described by Zhou *et al.* (2001). Mucin from porcine stomach type III (Sigma-Aldrich) and agar were added to medium B (minimal anaerobic culture medium) (Ruseler-van Embden *et al.*, 1995) without glucose at concentrations of 0.5 and 1.5% (w/v), respectively. A volume of 10 µl of an overnight liquid culture of *S. infantarius* LP90 was inoculated onto the surface of medium B. The plates were incubated anaerobically at 37 °C for 72 h, subsequently stained with amido black (0.1%, w/v) (Merck) in 3.5 M acetic acid (Merck) for 30 min, and then washed with 1.2 M acetic acid. A discolored zone around the spotted culture was considered as a positive result. A fresh fecal slurry from a healthy adult horse was used as positive control.

III.3.6.6. Deconjugation of bile salts

The ability of *S. infantarius* LP90 to deconjugate primary and secondary bile salts was determined according to Noriega *et al.* (2006). For this purpose, plates were prepared by adding sodium salts of taurocholate (TC) and taurodeoxycholate (TDC) (0.5%, w/v) (Sigma-Aldrich) to MRS agar supplemented with L-cysteine (0.05%, w/v) (Merck). A volume of 10 µl of an overnight culture of *S. infantarius* LP90 was spotted onto the MRS agar plates supplemented with the bile salts, and the plates were incubated anaerobically at 37 °C for 72 h. The presence of precipitated bile acid (seen as an opaque halo) around the spotted cultures was considered as a positive result. A fresh fecal slurry from a healthy adult horse was used as positive control.

III.3.7. PCR-detection of streptococcal and enterococcal bacteriocin structural genes in *S. infantarius* LP90

The presence of genes encoding previously described streptococcal and enterococcal bacteriocin structural genes in *S. infantarius* LP90 was determined by PCR using the primer pairs listed in Table III.4. PCR mixtures prepared as described above were subjected to an initial cycle of denaturation (97 °C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 45 sec), annealing (at an appropriate temperature for 30 sec) and elongation (72 °C for 30 to 1 min 45 sec), ending with a final extension step at 72 °C for 7 min in an Eppendorf Mastercycler DNA thermal cycler. PCR products were resolved and analyzed as described above. The molecular size markers used were HyperLadder II and 1Kb Plus DNA ladder.

Table III.4. Primers and PCR conditions for detection of bacteriocin structural genes.

Bacteriocins	Genes	Primer pairs	Primer sequence (5'-3')	T _m Product size		Strains used as PCR positive controls ^a	Primer references
				(C°)	(bp)		
Streptococcal bacteriocins							
Macedocin	<i>mcdA</i>	McdA-F1 McdA-R1	GGAAAAAATGCGGTATTTAAAAACC TTATGAGCAACATGTAGCAAG	58.0	81	Na	This study
Nisin U	<i>nisU</i>	Nsn-F1 Nsn-R1	ATAACTAGTAAATCATTAATGTACTCC TTATCCAAAATGACCAACCACAG	52.0	96	Na	This study
Thermophilin 1277	<i>thm1277</i>	Thm1277-F1 Thm1277-R1	GCAGATCGTGATGGATTAAAGAC TTAAGCACAAATTTTACAGGC	58.0	102	Na	This study
Thermophilin 13 (ThmA and ThmB)	<i>thm13A</i> <i>thm13B</i>	ThmA-F1	TACTCTGTAAAGATTGTTTAAAG	58.0	189	Na	This study
		ThmA-R1	TTAGTTAACTTATACCAATCATTCC				
		ThmB-F1	CAAATTAAITGGGATCAGTTGTAGG	62.0	132	Na	This study
		ThmB-R1	TTATATATCCATTATGATGCTTCC				
Ubericin A	<i>ubcA</i>	UbcA-F1 UbcA-R1	AAAACGTGTAATTTATGTTAATGGC TTATGCTCTCCCGCTGAGTG	58.0	150	Na	This study
Uberolisin	<i>ubIA</i>	UbIA-F1 UbIA-R1	CTCGCAGGATATACTGGGATAGC TTACCAAATGACACGCTTGTC	62.0	213	Na	This study
Enterococcal bacteriocins							
Cytolysin	<i>cyt_{LS}</i>	CyLLS-R1 CyLLS-R2	GTGTTGAGGAATGGAAGCG TCTCAGCCTGAACATCTCCAC	60.0	324	<i>E. faecalis</i> P4	Citti (2005)
Enterocin A	<i>enuA</i>	ENTERA-F ENTERA-R	ATGAAACATTTAAAAATTTTGCTATTAAAG TTAGCACTTCCTCGGAATTGCTCC	59.0	197	<i>E. faecium</i> T136	Brandão <i>et al.</i> (2010)
Enterocin AS-48	<i>enuAS-48</i>	AS48-R1-F AS48-R2-R	TCGGTATACGACGACGAGTT TGCTGCAGCGAGTTAAAGAAA	59.0	125	<i>E. faecalis</i> INIA-4	Citti (2005)
Enterocin B	<i>enbB</i>	EnbB3-F EnbB5-R	AGACCTAACCACTTATCTAAAG GTTGCATTTAGAGTATACATTGTC	50.0	126	<i>E. faecium</i> T136	Casaus <i>et al.</i> (1997)
Enterocin L50 (L50A and L50B)	<i>enl50 (enl50A and enl50B)</i>	Enl50-R1-F Enl50-R2-R	ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGC TTAATGCTCTTTTAGCCATTTTCAAT	65.0	286	<i>E. faecium</i> L50	Citti (2005)
Enterocin P	<i>enpP</i>	Enp1-F Enp2-R	ATGAGAAAAA AAAATTATTAGTTTAGCTCTTATTGG TTAATGTCCTATACCTGCCAAACGAG	64.0	216	<i>E. faecium</i> P13	Cintas <i>et al.</i> (1997)
Enterocin Q	<i>enqQ</i>	EnqQ-R1-F EnqQ-R2-R	ATGAATTTTCTTAAAAATGATATCGCAAAATG TTAACCAAGAAATTTTTCCTATGCGCAAG	57.0	105	<i>E. faecium</i> L50	Citti (2005)
Enterocin SE-K4	<i>enSE-K4</i>	SEK4-FW SEK4-RV	GCCACGTAATACGGAATGCTGTC TTATCTTCACCTATATACCACTTAACAG	53.0	146	<i>E. faecalis</i> K-4	Brandão <i>et al.</i> (2010)
Enterocin V583	<i>efl097</i>	EF1097-F3 EF1097-R3	GGCGATGGCAITTAATGACATTAAGG CTTAGCCCCACATTGAAGTCCCATAAAGC	65.0	408	<i>E. faecalis</i> V583	Brandão <i>et al.</i> (2010)
Enterocin 1071AB	<i>enl1071AB</i>	CFr-1 CFr-2	ATAATTAGGGGGAACGATAA ATACATTCTTCCACTTAATTTTT	51.0	403	<i>E. faecalis</i> FAIR-E309	Franz <i>et al.</i> (2002)
Enterolysin A	<i>enlA</i>	PELF-F PELF-R	CGAATTCGTGTAGGAAC GTACATCTCCATATACTTTCC	51.0	1,770	<i>E. faecalis</i> LMG2333	Hickey <i>et al.</i> (2003)
Hircin JM79	<i>hirJM79</i>	HNZSC-FW HPIE-RV	ATGAAAAAGAAAGATTAAAAACATTGTTATTCTAGG ATAAGTTAAGCTTGTAACCTTCTAGGTTGCCCATGGACC	61.0	250	<i>E. hirae</i> DCH5	Sánchez <i>et al.</i> (2007)

^aNa: not available

III.3.8. Purification, mass spectrometry and amino acid sequencing of the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by *S. infantarius* LP90

The bacteriocin secreted by *S. infantarius* LP90 was purified using a modification of the multi-chromatographic procedure described by Cintas *et al.* (1995). For this purpose, an overnight *S. infantarius* LP90 preculture was used to inoculate (0.1%, v/v) 1-liter of MRS broth, which was further incubated at 37 °C under aerobic conditions for 12 h. After the cells were removed by centrifugation, the CFS was subjected to precipitation with ammonium sulphate (50%, w/v) (Merck). The solution was stirred at 4 °C for 3 h and then centrifuged ($12,000 \times g$ at 4 °C for 30 min). The pellet and floating materials were mixed and solubilized in 200 ml of 20 mM of sodium phosphate buffer (NaP) (pH 6.0), and subsequently desalted by gel filtration (PD-10 columns; GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). The resulting fractions were further subjected to cation-exchange (HiPrep 16/10 SP XL, GE Healthcare) and reverse-phase (PepRPC HR 5/5, GE Healthcare) chromatographies, both performed in a Fast Protein Liquid Chromatography system (ÄKTA-FPLC) (GE Healthcare). The antimicrobial activity of the fractions obtained during the purification procedure was determined by an MPA using *S. pneumoniae* 66405 as indicator microorganism. The purified peptide was subjected to mass spectrometry analysis in a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Voyager-DE STR mass spectrometer (MALDI-TOF MS) (PerSeptive Biosystems, Foster City, California, USA) at the Mass Spectrum Service of Parque Científico-UCM (Madrid, Spain). N-terminal amino acid sequencing of the purified peptide was performed by Edman degradation using an ABI 494 Protein Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, California USA) at the Protein Chemistry Service of the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain). The protein BLAST software (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LIN K_LOC=blasthome) was used for amino acid similarity search.

III.4. RESULTS

III.4.1. Antimicrobial activity of bacteriocinogenic LAB against clinical *S. pneumoniae* strains

First, the direct antimicrobial activity of 38 bacteriocinogenic LAB against 9 clinical *S. pneumoniae* strains was determined by a SOAT, being remarkable that all LAB displayed a broad antimicrobial spectrum, inhibiting the growth of most indicators (Table III.5). Subsequently, the antimicrobial activity of CFSs from these LAB against 23 clinical *S. pneumoniae* strains was assayed by an ADT. The results revealed that 32 LAB strains (84.2%) exhibited extracellular antimicrobial activity against, at least, one of the tested *S. pneumoniae* strains (Table III.5). Interestingly, the CFS from *Streptococcus* sp. LP90 was very active, producing wide and sharp growth inhibition zones against all the tested

pneumococci. Moreover, *L. lactis* BB24 and *E. faecalis* DBH18 displayed a broad extracellular antimicrobial spectrum, inhibiting 22 of the tested indicators. However, *E. faecium* BMN58, *Lactococcus garvieae* DCC43 and *E. faecium* L50 showed an intermediate antimicrobial spectrum, inhibiting the growth of 18, 17 and 11 out of the 23 *S. pneumoniae* strains tested as indicators, respectively. On the other hand, *E. faecium* CV2 and *E. faecium* TPM76 displayed a narrow antimicrobial spectrum inhibiting 7 of the tested pneumococci. *E. faecium* LPP29, as well as *E. faecium* CV1 and *E. faecium* TPP2, were only active against 6 and 5 of the 23 *S. pneumoniae* tested strains, respectively. Likewise, *E. faecium* SMA7, *E. faecium* SMF8 and *E. faecium* BCS97 also showed a narrow anti-pneumococcal spectrum inhibiting 4 of the 23 strains tested. *E. faecium* CGM17, *E. faecium* DEC7, *E. faecium* DCH38 and *E. faecium* BCS35 displayed a very narrow antimicrobial spectrum only inhibiting the growth of 3 out of the 23 *S. pneumoniae* strains tested. *E. faecium* T136, *E. faecium* SMA10, *E. faecium* SMA36, *Enterococcus hirae* DCH5, *Pediococcus acidilactici* 347, and *P. acidilactici* QF154 only inhibited 2 of the tested pneumococci. Finally, *E. faecium* SMA8, *E. faecium* BCS59, *E. faecium* DCH37, *E. faecalis* DBH9, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* B11, *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus* SMA17, *Lb. sakei* subsp. *carnosus* SMM73, and *Pediococcus pentosaceus* LPV57 showed the narrowest antimicrobial spectrum inhibiting only 1 out of the 23 *S. pneumoniae* strains tested.

The 6 bacteriocinogenic LAB showing the broadest spectrum and strongest extracellular antimicrobial activity against the tested *S. pneumoniae* strains, including: (i) *Streptococcus* sp. LP90 (producer of an unknown bacteriocin), (ii) *L. lactis* BB24 (NisA producer), (iii) *E. faecalis* DBH18 (EntL50 [EntL50A and EntL50B] producer), (iv) *E. faecium* BNM58 (EntL50 [EntL50A and EntL50B], EntP and EntQ producer), (v) *L. garvieae* DCC43 (GarML producer), and (vi) *E. faecium* L50 (EntL50 [EntL50A and EntL50B], EntP and EntQ producer), were grown in MRS broth at different temperatures to ascertain the best conditions for maximum bacteriocin production, as determined by an ADT using 7 pneumococci as indicator strains (Table III.6). The highest antimicrobial activity was found in the following CFSs (temperature/growth time): *Streptococcus* sp. LP90 (37 °C/10-12 h), *L. lactis* BB24 (30 °C/10,12 and 16 h), *E. faecalis* DBH18 (30 °C/12-16 h), *E. faecium* BNM58 (30 °C/10 h), *L. garvieae* DCC43 (30 °C/12 h) and *E. faecium* L50 (30 °C/12-16h). Finally, the CFSs showing the highest antimicrobial activity were further challenged against the same 7 clinical strains by an MPA (Table III.6). The results obtained revealed that the CFS from *Streptococcus* sp. LP90 grown at 37 °C for 12 h displayed the strongest antimicrobial activity and the broadest anti-pneumococcal spectrum and, consequently, this strain was selected for further characterization.

Table III.5. Antimicrobial activity of bacteriocinogenic LAB against *S. pneumoniae* clinical strains.

LAB strains	<i>S. pneumoniae</i>											
	FQ6		FQ11		FQ21		FQ26		FQ27		FQ30	
	SOAT ^a	ADT ^b	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT
<i>E. faecium</i>												
L50	Nd	8.8 s-	Nd	7.5 s2	5.8 s+	Nd	9.0 s	9.0 s+	4.7 s-	Nd	6.4 s2	9.0 s2
QA54	Nd	Nd	Nd	Nd	5.0 s+	Nd	8.0 s-	Nd	4.3 s-	Nd	6.4 s2	Nd
QF387	Nd	Nd	Nd	Nd	4.8 s-	Nd	8.2 s-	Nd	4.6 s-	Nd	6.1 s	Nd
PI3	Nd	Nd	Nd	Nd	5.4 s-	Nd	7.8 s-	Nd	4.6 s-	Nd	5.7 s-	Nd
TI36	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	8.7 s-	Nd	4.4 s-	Nd	6.5 s	Nd
CV1	Nd	8.7 s-	Nd	Nd	Nd	Nd	7.3 s-	Nd	Nd	Nd	6.0 s2	Nd
CV2	Nd	6.7 s-	Nd	6.7 s2	5.5 s+	Nd	8.6 s+	Nd	3.6 s+	Nd	7.2 s	8.0 s-
TPP2	Nd	Nd	Nd	7.5 s2	5.9 s+	Nd	8.8 s+	Nd	3.9 s+	Nd	6.7 s2	8.0 s-
TPM76	Nd	8.7 s-	Nd	7.6 s2	7.5 s+	Nd	8.4 s+	Nd	4.9 s+	Nd	7.0 s2	8.0 s-
LPP29	Nd	8.7 s-	Nd	Nd	5.5 s-	Nd	8.2 s-	Nd	4.7 s-	Nd	7.3 s	Nd
SMA7	Nd	Nd	Nd	Nd	4.7 s	Nd	6.3 s	Nd	3.9 s+	Nd	6.0 s2	Nd
SMA8	Nd	Nd	Nd	Nd	5.3 s+	Nd	8.0 s	Nd	4.0 s+	Nd	6.0 s2	Nd
SMA10	Nd	Nd	Nd	Nd	5.9 s2	Nd	9.5 s	Nd	4.4 s+	Nd	7.0 s2	Nd
SMA36	Nd	Nd	Nd	Nd	6.0 s+	Nd	7.9 s-	Nd	4.4 s	Nd	4.9 s-	Nd
SMF8	Nd	Nd	Nd	Nd	5.3 s+	Nd	7.9 s+	Nd	4.4 s+	Nd	6.7 s2	Nd
BNM58	Nd	9.3 s-	Nd	10.0 s2	6.8 s2	Nd	8.5 s+	Nd	5.0 s+	Nd	6.4 s2	7.4 s2
CGM17	Nd	Nd	Nd	Nd	5.3 s+	Nd	8.6 s+	Nd	4.5 s+	Nd	6.4 s2	Nd
BCS59	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	7.7 s-	Nd	4.9 s2	Nd	5.0 s-	Nd
BCS97	Nd	Nd	Nd	Nd	5.9 s2	Nd	8.0 s+	Nd	4.9 s2	Nd	6.0 s	Nd
HS38	Nd	Nd	Nd	Nd	5.0 s-	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	8.0 s	Nd
DEC7	Nd	Nd	Nd	Nd	3.6 s-	Nd	8.0 s+	Nd	4.8 s-	Nd	6.3 s-	Nd
DCH37	Nd	Nd	Nd	Nd	6.4 s+	Nd	8.7 s2	Nd	5.5 s+	Nd	6.5 s	Nd
DCH38	Nd	Nd	Nd	Nd	4.7 s	Nd	8.3 s2	Nd	4.7 s-	Nd	6.2 s	Nd
<i>E. faecalis</i>												
DBH18	Nd	11.0 s-	Nd	9.8 s2	10.5 s2	9.3 s2	9.2 s2	10.0 s+	9.2 s+	11.0 s2	8.6 s2	11.0 s2
PB1	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	8.0 s-	Nd	8.0 s-	Nd	4.8 s	Nd
DBH9	Nd	Nd	Nd	Nd	4.0 s-	Nd	7.8 s-	Nd	7.8 s-	Nd	Nd	Nd
<i>E. hirae</i>												
DCH5	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	8.3 s-	Nd	8.3 s-	Nd	6.5 s	Nd
<i>L. lactis</i>												
BB24	Nd	11.0 s-	Nd	11.0 s2	4.9 s+	7.6 s2	13.2 s+	13.0 s+	13.2 s+	8.0 s2	5.8 s	12.0 s2
QA13	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	7.3 s-	Nd	7.3 s-	Nd	5.6 s	Nd
<i>L. garvieae</i>												
DCC43	Nd	9.9 s-	Nd	9.8 s2	5.6 s+	8.0 s2	8.4 s	9.0 s+	8.4 s	8.2 s2	Nd	7.0 s2
<i>Lb. sakei</i>												
B11	Nd	Nd	Nd	Nd	6.9 s-	Nd	9.9 s-	Nd	9.9 s-	Nd	8.0 s	Nd
<i>Lb. sakei carnosus</i>												
SMA17	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	8.3 s-	Nd	8.3 s-	Nd	Nd	Nd
SMM73	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>Lb. curvatus curvatus</i>												
BCS35	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	7.8 s-	Nd	7.8 s-	Nd	Nd	Nd
<i>P. acidilactici</i>												
347	Nd	Nd	Nd	Nd	3.6 s-	Nd	11.9 s-	Nd	11.9 s-	Nd	8.9 s	Nd
QF154	Nd	Nd	Nd	Nd	6.6 s-	Nd	12.2 s-	Nd	12.2 s-	Nd	7.5 s	Nd
<i>P. pentosaceus</i>												
LPV57	Nd	Nd	Nd	Nd	7.0 s-	Nd	10.0 s-	Nd	10.0 s-	Nd	9.2 s	Nd
<i>Streptococcus</i> sp.												
LP90	Nd	12.0 s-	Nd	11.5 s2	Nd	8.4 s2	7.7 s-	15.0 s+	7.7 s-	8.9 s2	6.0 s-	11.0 s2

Table III.5. Continued.

LAB strains		S. pneumoniae																						
		49083		49781		52084		66405		67620		70423		99828		111692		121404		121411		15M-1047		
<i>E. faecium</i>		SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	SOAT	ADT	
L50	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.9 s2	Nd	Nizd	Nd	8.0 s+	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.6 s2
QA54	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
QF387	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
P13	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
T136	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
CV1	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.2 s2
CV2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.6 s2
TPP2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.4 s2
TPM76	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.1 s2
LP29	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.9 s2	Nd	Nizd	Nd	7.6 s-	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.3 s2
SMA7	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	18.8 s-	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.3 s2
SMA8	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.0 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
SMA10	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.3 s-	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
SMA36	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	20.0 s-	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
SMF8	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.0 s-	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.5 s2
BNM58	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	9.8 s2	Nd	Nizd	Nd	9.2 s2	Nd	Nizd	Nd	8.5 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.1 s2
CGM17	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.0 s-	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.6 s2
BCS59	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	18.6 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
BCS97	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.8 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.9 s2
HS38	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
DEC7	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.4 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
DCH37	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.1 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
DCH38	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	16.4 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	9.5 s2
<i>E. faecalis</i>																								
DBH18	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	10.6 s-	Nd	Nizd	Nd	9.9 s2	Nd	Nizd	Nd	10.3 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	12.3 s2
PB1	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
DBH9	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.4 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
<i>E. hirae</i>																								
DCH5	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
<i>L. lactis</i>																								
BB24	Nd	15.8 s2	Nd	Nizd	Nd	11.1 s2	Nd	Nizd	Nd	10.9 s2	Nd	13.2 s2	Nd	13.0 s2	Nd	10.7 s2	Nd	16.5 s+	Nd	12.0 s2	Nd	13.7 s2	Nd	11.0 s2
QA13	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
<i>L. garvieae</i>																								
DC43	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	9.8 s-	Nd	7.4 s2	Nd	Nizd	Nd	9.4 s2	Nd	Nizd	Nd	9.8 s2	Nd	Nizd	Nd	7.9 s2	Nd	8.1 s2	Nd	10.2 s2
<i>Lb. sakei</i>																								
B11	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.8 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
<i>Lb. sakei carnosus</i>																								
SMA17	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	19.4 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
SMN173	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	19.2 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
<i>Lb. curvulus curvulus</i>																								
BCS35	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.0 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
<i>P. acidilactici</i>																								
347	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
QF154	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
<i>P. pentosaceus</i>																								
LPV57	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	17.8 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd
<i>Streptococcus</i> sp.																								
LP90	Nd	12.6 s2	Nd	11.7 s2	Nd	8.9 s2	Nd	12.5 s2	Nd	11.6 s2	Nd	12.6 s2	Nd	11.4 s2	Nd	13.7 s2	Nd	11.3 s2	Nd	11.7 s2	Nd	13.3 s2	Nd	13.3 s2

*Direct antimicrobial activity as determined by a SOAT and ^bextracellular antimicrobial activity as determined by an ADT using 50 µl of CFS, both expressed as the diameter of the inhibition zones in mm. Inhibition zones are differentiated as follows: s= slightly sharp, s+= very sharp, s2= greatly sharp, Nizd, no inhibition zone detected, Nd, not determined.

Table III.6. Anti-pneumococcal extracellular activity of six selected bacteriocinogenic LAB.

LAB strains	<i>S. pneumoniae</i>													
	FQ26		FQ30		FQ33		FQ39		52084		67620		15M-1047	
Growth conditions	ADT ^a	MPA ^b	ADT	MPA	ADT	MPA	ADT	MPA	ADT	MPA	ADT	MPA	ADT	MPA
<i>E. faecium</i> L50														
30 °C/6 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
30 °C/10 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
30 °C/12 h	7.1 s	Nid	Nizd	Nid	Nizd	Nid	Nizd	Nid	Nizd	Nid	Nizd	Nid	Nizd	Nid
30 °C/16 h	6.6 s	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/6 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/10 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/12 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/16 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
<i>E. faecium</i> BNM58														
30 °C/6 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
30 °C/10 h	8.3 s2	Nid	Nizd	Nid	Nizd	32.3	Nizd	30.0	7.8 s2	29.7	Nizd	Nid	Nizd	Nid
30 °C/12 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.0 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
30 °C/16 h	6.8 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	6.9 s2	Nd	Nizd	Nd	7.9 s2	Nd
37 °C/6 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/10 h	7.3 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.4 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/12 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/16 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
<i>E. faecalis</i> DBH18														
30 °C/6 h	7.2 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.4 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
30 °C/10 h	11.2 s2	Nd	9.8 s2	Nd	10.0 s2	Nd	7.5 s2	Nd	11.1 s2	Nd	Nizd	Nd	10.4 s2	Nd
30 °C/12 h	11.2 s2	58.0	10.0 s	31.0	8.5 s2	32.6	8.7 s2	Nd	8.0 s2	Nd	10.5 s2	Nd	9.9 s2	58.0
30 °C/16 h	10.5 s2	33.0	10.1 s	40.0	10.2 s2	Nid	9.2 s2	51.9	7.8 s2	33.5	10.7 s2	28.6	10.8 s2	46.0
37 °C/6 h	9.8 s2	Nd	8.3 s-	Nd	Nizd	Nd	7.2 s2	Nd	9.5 s	Nd	Nizd	Nd	8.0 s2	Nd
37 °C/10 h	10.2 s2	Nd	9.8 s2	Nd	8.3 s2	Nd	8.0 s	Nd	10.5 s2	Nd	Nizd	Nd	10.0 s2	Nd
37 °C/12 h	10.2 s2	Nd	10.4 s	Nd	9.3 s2	Nd	9.4 s2	Nd	7.9 s2	Nd	9.8 s2	Nd	9.2 s2	Nd
37 °C/16 h	10.5 s2	Nd	9.5 s	Nd	9.7 s2	Nd	9.3 s2	Nd	7.6 s2	Nd	10.5 s2	Nd	10.2 s2	Nd
<i>L. lactis</i> BB24														
30 °C/6 h	8.2 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	7.8 s	Nd	Nizd	Nd
30 °C/10 h	11.5 s2	Nd	11.8 s-	Nd	10.1 s2	Nd	9.0 s2	Nd	10.6 s	Nd	12.0 s2	Nd	10.2 s	Nd
30 °C/12 h	11.1 s2	121.8	10.6 s-	95.0	10.6 s2	110.5	9.0 s2	60.9	Nizd	94.0	12.6 s2	125.9	8.4 s2	70.0
30 °C/16 h	10.2 s2	104.7	11.4 s-	72.0	9.6 s2	90.4	8.1 s2	Nd	11.1 s	Nd	Nizd	Nd	8.8 s2	90.0
37 °C/6 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/10 h	9.0 s2	Nd	9.0 s	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.4 s	Nd	7.5 s	Nd
37 °C/12 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/16 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
<i>L. garviae</i> DCC43														
30 °C/6 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
30 °C/10 h	9.1 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.8 s2	Nd	Nizd	Nd
30 °C/12 h	8.9 s2	Nid	Nizd	32.5	9.3 s2	Nid	Nizd	Nid	Nizd	29.0	11.0 s2	30.1	9.7 s	38.0
30 °C/16 h	8.9 s2	Nd	Nizd	Nd	8.5 s2	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	9.7 s2	Nd	8.5 s	Nd
37 °C/6 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/10 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/12 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
37 °C/16 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
<i>S. infantarius</i> LP90														
30 °C/6 h	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd
30 °C/10 h	9.5 s2	Nd	Nizd	Nd	9.3 s2	Nd	13.7 s-	Nd	Nizd	Nd	Nizd	Nd	8.6 s	Nd
30 °C/12 h	11.0 s2	Nd	9.7 s	Nd	11.4 s2	Nd	14.1 s-	Nd	Nizd	Nd	9.9 s2	Nd	9.8 s2	Nd
30 °C/16 h	11.8 s2	Nd	9.5 s2	Nd	9.5 s2	Nd	13.3 s-	Nd	Nizd	Nd	8.0 s2	Nd	11.2 s	Nd
37 °C/6 h	11.1 s2	Nd	10.8 s2	Nd	11.3 s2	Nd	8.6 s-	Nd	Nizd	Nd	9.3 s	Nd	12.3 s2	Nd
37 °C/10 h	12.7 s2	100.0	11.5 s2	158.5	12.0 s2	249.6	15.4 s-	143.3	Nizd	25.3	11.0 s2	143.8	11.6 s2	125.0
37 °C/12 h	13.0 s2	124.0	12.0 s2	131.0	11.6 s2	243.3	14.6 s-	130.0	Nizd	128.9	11.5 s2	Nd	12.6 s2	125.0
37 °C/16 h	12.0 s2	Nd	10.3 s2	Nd	10.4 s2	Nd	14.4 s-	Nd	Nizd	Nd	9.2 s	Nd	10.2 s	Nd

^aExtracellular antimicrobial activity as determined by an ADT and expressed as the diameter of the inhibition zones in mm. Inhibition zones are differentiated as follows: s= slightly sharp, s= sharp, s+= very sharp, s2= greatly sharp. Nizd, no inhibition zone detected using 50 µl of CFS. Nd, not determined.

^bAntimicrobial activity (BU/ml) as determined by an MPA. Nid, no inhibition detected using 100 µl of CFS; Nd, not determined.

III.4.2. Taxonomic identification of *Streptococcus* sp. LP90

Comparison of the *sodA* DNA sequence from *Streptococcus* sp. LP90 with those present in the nucleotide sequence databases allowed the taxonomic identification of this strain as *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*.

III.4.3. Influence of growth media and incubation conditions on bacterial growth, culture-pH and anti-pneumococcal activity of *S. infantarius* LP90

The influence of growth media and incubation conditions on bacterial growth, culture-pH and anti-pneumococcal activity was periodically assessed in cultures and the respective CFS of *S. infantarius* LP90 grown in MRS, GM17, BHI, TSB and THB at 37 °C for 18 h (Table III.7). *S. infantarius* LP90 reached the stationary phase at 10 h in all the assayed media, displaying the maximum OD₆₀₀ (approx., 1.30) in GM17 broth under both aerobic and anaerobic atmospheres. Concerning pH, the initial values of GM17 broth (pH 6.9), BHI broth (pH 7.4), TSB (pH 7.3) and THB (pH 7.8) dropped to 5.3 and 5.4 (GM17 broth under aerobic and anaerobic conditions, respectively), 5.4 (BHI broth), 5.5 (TSB) and 6.2 (THB) during the exponential phase, and remained stable during the stationary phase. However, the pH of the cultures grown in MRS broth (pH 6.2) continued to decrease up to 18 h of growth under both aerobic and anaerobic atmospheres, reaching a final value of approximately 4.3. On the other hand, anti-pneumococcal activity was only detected in the CFSs obtained from the cultures grown in MRS broth, and to a lesser extent, in GM17 broth. The maximum anti-pneumococcal activity (120 BU/ml) was detected in MRS broth under aerobic conditions at the beginning of the stationary phase (10-12 h), and decreased to 90 BU/ml during further incubation. However, the maximum anti-pneumococcal activity detected in GM17 broth, which was similar in aerobiosis and anaerobiosis (28 and 32 BU/ml, respectively), was found at the middle of the stationary phase (14 h) and remained stable during further incubation.

III.4.4. Physicochemical stability of the anti-pneumococcal compound secreted by *S. infantarius* LP90

The physicochemical stability of the anti-pneumococcal compound secreted by *S. infantarius* LP90 was tested by subjecting CFSs to heat, pH and enzymatic treatments. The residual anti-pneumococcal activity (%) was detected by an ADT and calculated by an MPA using *S. pneumoniae* 66405 as indicator microorganism. As shown in Fig. 3.1 (panel A), the CFS withstood heat treatment at 100 °C for 10, 30 and 60 min, showing a residual anti-pneumococcal activity of 94, 52 and 28%, respectively. On the other hand, the antimicrobial compound present in the CFSs showed a high pH-stability (pH 4.4, 5.0, and 8.0), retaining a residual anti-pneumococcal activity of approximately 95%. Aliquots of MRS broth adjusted to the same pH values as the CFS did not show any antimicrobial activity (Fig. 3.1, panel B). Finally, the CFS subjected to digestion with proteolytic enzymes (proteinase K and pepsine)

Table III.7. Influence of growth media and incubation conditions on bacterial growth, culture-pH and anti-pneumococcal activity of *S. infantarius* LP90.

Growth conditions (Culture broth/atmosphere)	t (h)	OD ₆₀₀	pH	BU/ml ^a
MRS broth/aerobiosis				
	10	0.87	4.47	120.00
	12	0.90	4.38	115.00
	14	0.87	4.33	95.00
	16	0.87	4.32	91.00
	18	0.91	4.27	90.00
MRS broth/anaerobiosis				
	10	0.93	4.53	68.00
	12	0.96	4.45	70.00
	14	0.94	4.39	88.00
	16	0.92	4.34	80.00
	18	0.94	4.28	62.00
GM17 broth/aerobiosis				
	10	1.24	5.31	26.00
	12	1.30	5.33	26.00
	14	1.27	5.36	28.00
	16	1.30	5.33	27.00
	18	1.28	5.34	27.00
GM17 broth/anaerobiosis				
	10	1.22	5.40	30.00
	12	1.22	5.42	30.00
	14	1.27	5.46	32.00
	16	1.28	5.42	32.00
	18	1.26	5.43	31.00
BHI broth/aerobiosis				
	10	0.86	5.42	Nid
	12	0.88	5.41	Nid
	14	0.89	5.42	Nid
	16	0.84	5.44	Nid
	18	0.89	5.42	Nid
TSB/aerobiosis				
	10	0.62	5.50	Nid
	12	0.64	5.51	Nid
	14	0.62	5.53	Nid
	16	0.61	5.54	Nid
	18	0.63	5.52	Nid
THB/aerobiosis				
	10	0.60	6.24	Nid
	12	0.62	6.20	Nid
	14	0.61	6.22	Nid
	16	0.57	6.20	Nid
	18	0.60	6.20	Nid

^aAntimicrobial activity (BU/ml) against *S. pneumoniae* FQ30 as determined by an MPA. Nid, no inhibition detected using 100 µl of CFS.

only retained a 10 and 20% of their original anti-pneumococcal activity, respectively, but withstood treatments with lipolytic and glycolytic enzymes, showing a residual antimicrobial activity of approximately 94%. Aliquots of MRS broth containing the enzymes in the same concentration as used in the treatments did not show any antimicrobial activity (Fig. 3.1, panel C). Taken together, these results suggest that the extracellular antimicrobial activity against *S. pneumoniae* exerted by *S. infantarius* LP90 is due to the secretion of a heat- and pH-stable proteinaceous compound (*i.e.*, bacteriocin).

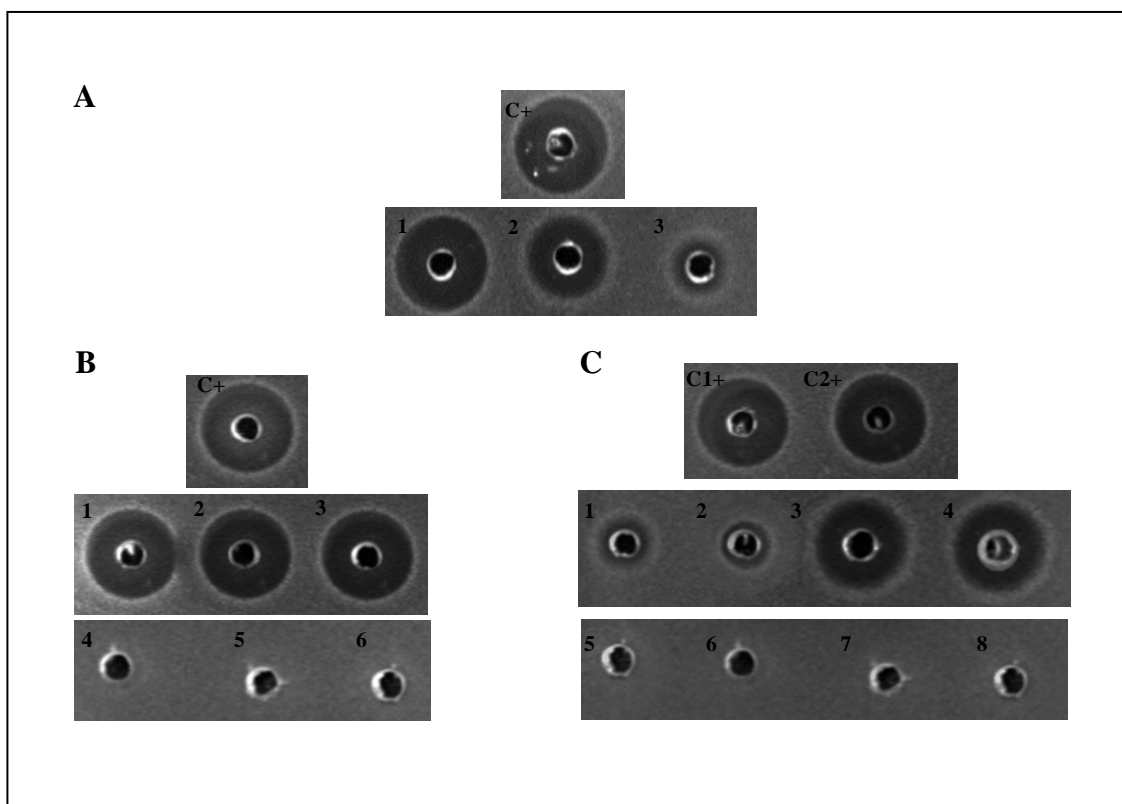


Figure 3.1. Antimicrobial activity of CFS from *S. infantarius* LP90 subjected to different treatments, as determined by an ADT. A: CFS heated at 100 °C for 10 (1), 30 (2), and 60 min (3); C+: untreated CFS. B: CFS at pH 4.4 (1), 5.0 (2), and 8.0 (3), and aliquots of MRS broth adjusted to pH 4.4 (4), 5.0 (5) and 8.0 (6); C+: CFS adjusted to pH 6.2. C: CFS subjected to enzymatic treatments with pepsine (1), proteinase K (2), lipase (3), and α -amylase (4), and aliquots of MRS broth with pepsine (5), proteinase K (6), lipase (7), and α -amylase (8). Supernatants adjusted to pH 6.2 (C+) and pH 2.0 (C2+) were used as positive controls.

III.4.5. Safety assessment of *S. infantarius* LP90

The safety assessment of *S. infantarius* LP90 included the following assays: (i) antibiotic susceptibility testing; (ii) phenotypic detection of gelatinase, haemolytic and protease activity; (iii) PCR-evaluation of the presence of streptococcal and enterococcal virulence factor genes; (iv) phenotypic and genetic evaluation of biogenic amine production, and phenotypic evaluation of (v) enzymatic activities, (vi) mucin degradation, and (vii) bile salt deconjugation.

The antibiotic susceptibility profile of *S. infantarius* LP90 determined by the broth microdilution test revealed that this strain is sensitive to ampicillin, vancomycin, erythromycin, tetracycline, clindamycin, chloramphenicol, kanamycin, gentamycin, and streptomycin according to the respective breakpoints established for *S. thermophilus* by EFSA (2012) (Table III.8).

Table III.8. Antibiotic susceptibility of *S. infantarius* LP90^a.

Antibiotic		Test range (µg/ml)	MICs (µg/ml) ^b	FEEDAP BPs values ^{c, d}	Susceptibility/ Resistance ^d
Mechanism of action/ Family					
Cell wall synthesis inhibitors					
Penicillins	Ampicillin	0.03-16	0.12	2	S
	Penicillin	0.03-16	≤0.06	Nav	Na
Glycopeptides	Vancomycin	0.25-128	0.50	4	S
Protein synthesis inhibitors					
Macrolides	Erythromycin	0.016-8	0.12	2	S
Streptogramins	Virginiamycin	0.016-8	≤0.25	Nav	Na
Tetracyclines	Tetracycline	0.12-64	0.25	4	S
Lincosamides	Clindamycin	0.03-16	0.06	2	S
Amphenicols	Chloramphenicol	0.12-64	2.00	4	S
Aminoglycosides	Kanamycin	2-1024	64.00	64	S
	Gentamycin	0.5-256	2.00	32	S
	Streptomycin	0.5-256	32.00	64	S
	Neomycin	0.5-256	≤8.00	Nav	Na
Oxazolidinone	Linezolid	0.25-16	≤1.00	Nav	Na
Nucleic acid synthesis inhibitors					
Rifamycins	Rifampicin	0.12-64	≤0.50	Nav	Na
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	0.25-128	≤2.00	Nav	Na
Trimethoprim	Trimethoprim	0.12-64	≤32.00	Nav	Na

^aAntibiotic susceptibility determined by a broth microdilution test. MICs were defined as the lowest concentration of the antibiotic at which no growth was detected. ^bMICs determined by a VetMIC test; ^cBreakpoints (BPs) for *S. thermophilus* proposed by EFSA (2012). BPs for penicillin, virginiamycin, neomycin, linezolid, rifampicin, ciprofloxacin, and trimethoprim are not available (Nav).

^dBased on the EFSA (2012) BPs, *S. infantarius* LP90 was categorized as susceptible (S) or resistant (R) to the corresponding antibiotic. Na, not applicable.

On the other hand, *S. infantarius* LP90 showed no hemolysin, gelatinase and protease activities (results not shown). Likewise, none of the tested genes encoding streptococcal and enterococcal virulence factors were detected in this strain (results not shown). Analysis of biogenic amines production by the plate assay did not detect HDC, TDC and ODC activities in *S. infantarius* LP90, and, as expected, PCR screening for the presence of amino acid decarboxylase genes showed that *hdc*, *tdc* and *odc* were absent in this strain (results not shown). The analysis of enzymatic activity profiles revealed that only the peptidase activities leucine and cystine arylamidase were found in this strain (results not shown). Mucine degradation and bile salt deconjugation abilities were not detected in *S. infantarius* LP90 (results not shown).

III.4.6. PCR-detection of streptococcal and enterococcal bacteriocin structural genes in *S. infantarius* LP90

With regard to the PCR-detection of structural genes encoding streptococcal and enterococcal bacteriocins in *S. infantarius* LP90, the results showed that this bacteriocinogenic strain did not amplify any of the previously described bacteriocin genes tested (results not shown).

III.4.7. Purification, mass spectrometry and amino acid sequencing of the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by *S. infantarius* LP90

The results of the purification of the anti-pneumococcal bacteriocin from a CFS of *S. infantarius* LP90 using a multichromatographic procedure are summarized in Table III.9. Ammonium sulphate precipitation of the proteins present in the CFS allowed an increase in the specific anti-pneumococcal activity of 5-fold, and a recovery of 34% of the original anti-pneumococcal bacteriocin activity. The ammonium sulphate precipitate was desalted prior to the cation-exchange FPLC to facilitate the bacteriocin binding to the cation exchanger matrix. The fraction obtained from the gel filtration chromatography showed a recovery of 39% of the original anti-pneumococcal activity, and a 13-fold increase in the specific anti-pneumococcal activity. The fraction resulting from the cation-exchange FPLC represented a 56% of the anti-pneumococcal activity originally present, and an increase in the specific antimicrobial activity of 12,800-fold. Finally, the reversed-phase-FPLC resulted in a single well-separated absorbance peak with anti-pneumococcal activity, which eluted at 32% (v/v) 2-propanol in aqueous 0.1% (v/v) TFA (Fig. 3.2). This fraction showed a recovery of 20% of the original anti-pneumococcal activity, and an increase in the specific anti-pneumococcal activity of 18,500-fold.

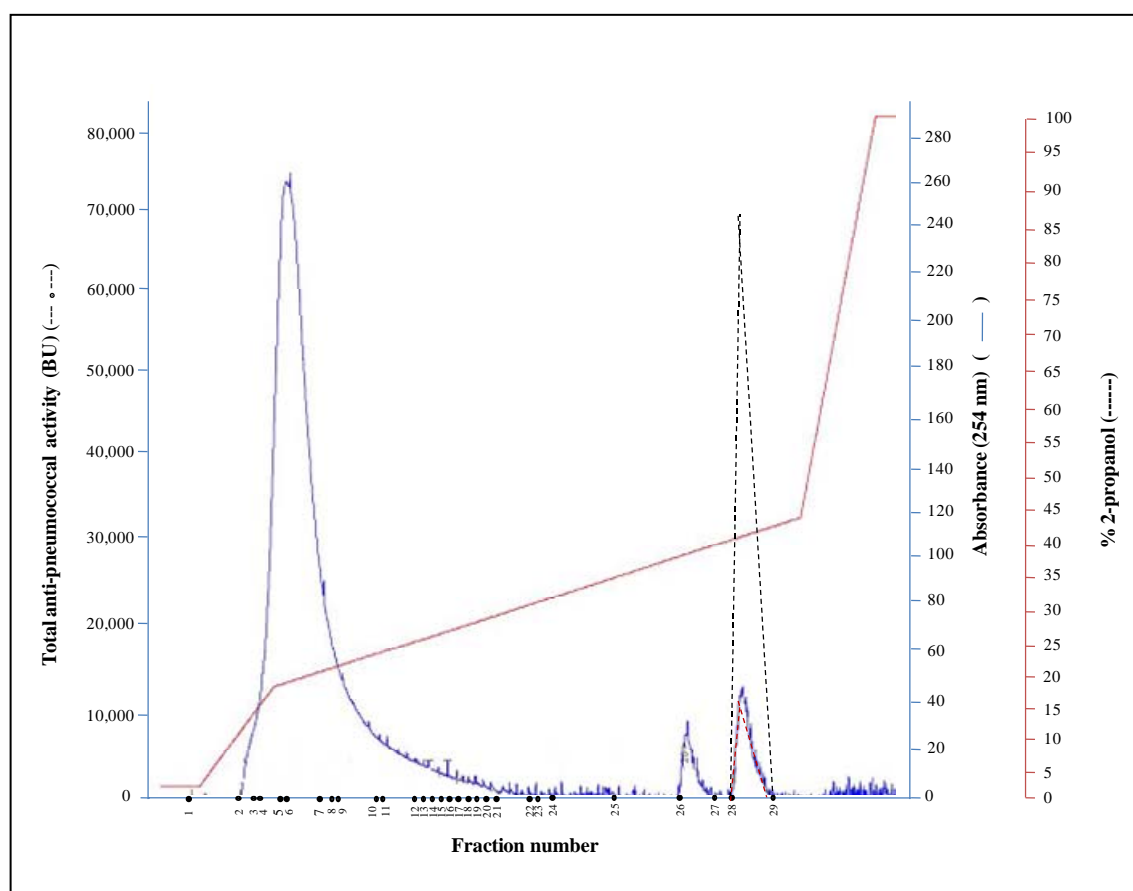


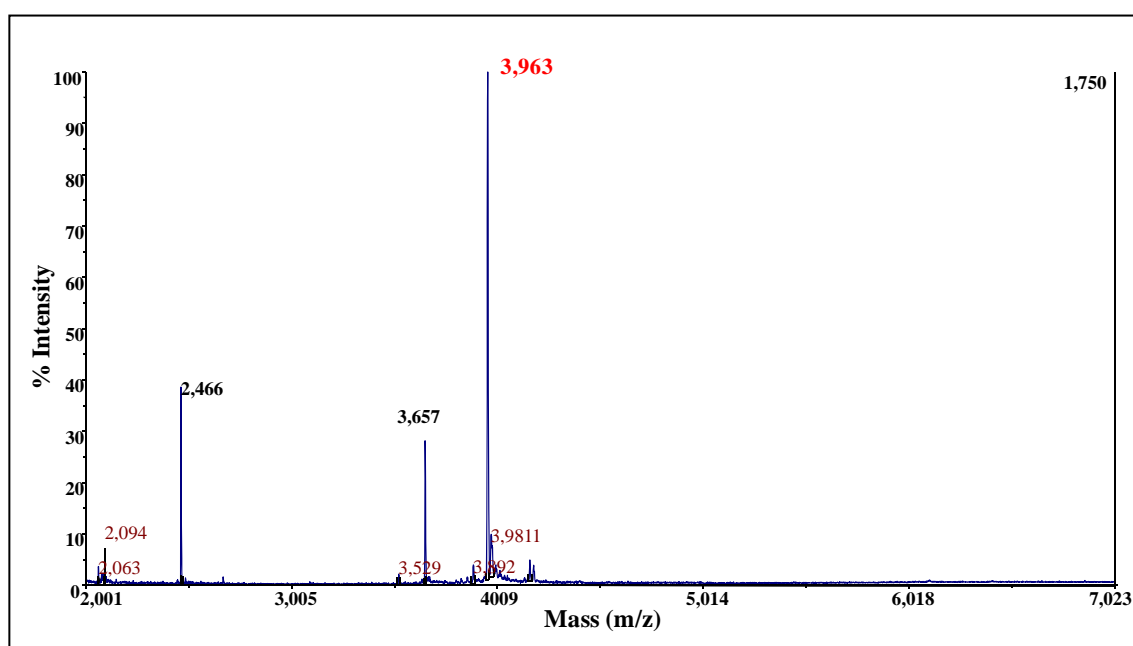
Figure 3.2. RP-FPLC chromatography of the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by *S. infantarius* LP90.

Table III.9. Purification of the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by *S. infantarius* LP90.

Purification stage	Volume (ml)	Total A_{254} ^a	Total activity (10^3 BU) ^b	Sp. act. (BU/ A_{254}) ^c	Increase in sp. act. (fold) ^d	Yield (%)
Culture supernatant	1,000.0	27,300.0	354.0	13.0	1.0	100.0
Ammonium sulphate precipitation	200.0	1,800.0	120.0	67.0	5.0	34.0
Gel filtration chromatography	280.0	840.0	140.0	167.0	13.0	39.5
Cation-exchange FPLC	12.0	1.2	200.0	167,000.0	12,800.0	56.5
Reverse-phase FPLC	2.0	0.3	72.0	240,000.0	18,500.0	20.0

^aAbsorbance at 254 nm (A_{254}) multiplied by the volume in milliliters. ^bAntimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 in bacteriocin units per milliliter (BU/ml) as determined by an MPA multiplied by the total volume in milliliters. ^cSpecific activity expressed as the total antimicrobial activity (BU) divided by the total A_{254} . ^dThe specific antimicrobial activity of a fraction (BU/ A_{254}) divided by the specific antimicrobial activity of the culture supernatant (BU/ A_{254}).

The purity and molecular mass of the purified anti-pneumococcal bacteriocin secreted by *S. infantarius* LP90 was confirmed by MALDI-TOF MS, which revealed a major peptide with a molecular mass of 3,963 Da (Fig. 3.3).

**Figure 3.3. Mass spectrometry analysis of the purified anti-pneumococcal bacteriocin secreted by *S. infantarius* LP90.**

An N-terminal amino acid sequence of 19 residues was obtained by Edman degradation of the 3,963 Da peptide (Fig. 3.4). Comparison of this sequence with those present at the Genbank databases revealed that the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by *S. infantarius* LP90 is highly similar (74% of identity) to a hypothetical protein of unknown biological function deduced from the *S. infantarius* subsp. *infantarius* ATCCBAA-102 genome (accession no.

ZP_02920122¹) (Fig. 3.4). The novel bacteriocin produced by *S. infantarius* LP90 identified and partially characterized in our work was termed infantaricin A (InfA).

		1	10	20	30	
Infantaricin A	N	SIAV	KL	VN	QG	F
						G
						A
						I
						X
						S
						F
						I
						D

						C
Hypothetical protein	N	DDLY	KL	VN	QG	F
						G
						A
						I
						C
						S
						F
						I
						D
						G
						F
						N
						G
						K
						K
						Y
						R
						G
						K
						C
						C

Figure 3.4. Amino acid sequence alignment of the partial N-terminal sequence of the anti-pneumococcal bacteriocin infantaricin A secreted by *S. infantarius* LP90 and a hypothetical protein of unknown function deduced from the *S. infantarius* ATCCBAA-102 genome (accession no. ZP_02920122). The alignment was performed using the program SIM (<http://web.expasy.org/sim>). Identical residues are shaded in grey. “X” indicates an unidentified residue.

III.5. DISCUSSION

S. pneumoniae infections are one of the major causes of morbidity and mortality worldwide (Braido *et al.*, 2008; Rightmier *et al.*, 2011). Currently, the treatment of these diseases represents a challenge because of the emergence of multidrug-resistance amongst pneumococci (McGee *et al.*, 2001; Van Bambeke *et al.*, 2007). In this respect, bacteriocins produced by LAB might constitute an alternative or complementary treatment to traditional antibiotics. Bacteriocins and antibiotics differ in terms of synthesis, mode of action, toxicity and, most importantly, mechanisms which confer resistance against them in bacteria (Cleveland *et al.*, 2001). In this respect, while antibiotic resistance is usually associated with genetic determinants facilitating the transfer of resistance between strains and species, resistance to bacteriocins is usually the result of physiological changes occurring in the target cell membrane (Cleveland *et al.*, 2001; Riley and Wertz, 2002; Piper *et al.*, 2009b). Nevertheless, recent studies have shown the existence of other mechanisms of resistance to bacteriocins, including: (i) the occurrence of mutations in the genes encoding intracellular bacteriocin targets (Yuzenkova *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2013); (ii) the presence of bacteriocin immunity proteins in non-bacteriocin-producing strains, or in strains producing a closely related bacteriocin (Drapper *et al.*, 2009; Cotter *et al.*, 2013), and (iii) the proteolytic cleavage of bacteriocins (Sun *et al.*, 2009; Cotter *et al.*, 2013). In this context, potential solutions to avoid or to decrease the development of resistance against

¹ The partial nucleotide sequence of the InfA bacteriocin gene cluster of *S. infantarius* LP90 (6,943 bp) was deposited in March 2010 at the GenBank sequence database with accession number ADF87548. The accession number of the *S. infantarius* ATCCBAA-102 hypothetical protein of unknown function (ZP_02920122) was replaced in August 2012 by EDT47634, and the protein was then redefined as a “bacteriocin-type signal sequence”. Note: the complete nucleotide sequence of the InfA bacteriocin gene cluster of *S. infantarius* LP90 (19,539 bp) was deposited in February 2014 at the GenBank sequence database with accession number KJ475434.

bacteriocins used as therapeutics include the design of new compounds able to bind mutated receptors, the modification of peptides to reduce their sensitivity to proteases, and the combined use of bacteriocins with different mechanisms of action or of bacteriocins and antimicrobials (Cotter *et al.*, 2013). Several LAB bacteriocins have been shown to inhibit *S. pneumoniae*, such as: (i) NisA (Goldstein *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2013), which is the most widely characterized bacteriocin and the only one that has been legally approved as a food additive (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Cotter *et al.*, 2005b; Healy *et al.*, 2013); (ii) AP-CECT7121, an antimicrobial peptide produced by *E. faecalis* CECT7121 (Sparo *et al.*, 2009); (iii) salivaricin D, a lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius* 5M6c (Birri *et al.*, 2011), and (iv) salivaricin B, a lantibiotic produced by *S. salivarius* K12 (Wescombe *et al.*, 2009). In this work, we tested the anti-pneumococcal activity of 38 bacteriocinogenic LAB isolated from food and other sources against clinical pneumococci in order to identify the most active strains. In this respect, most of these LAB (32 out of 38, 84.2%) displayed extracellular antimicrobial activity against, at least, one of the *S. pneumoniae* strains. From them, 6 strains, namely *Streptococcus* sp. LP90, *L. lactis* BB24, *E. faecalis* DBH18, *E. faecium* BNM58, *L. garvieae* DCC43 and *E. faecium* L50, were identified as the most active anti-pneumococcal bacteriocin producers. In this context, *Streptococcus* sp. LP90, a strain isolated from Venezuelan water buffalo milk (Citti, 2005) and taxonomically identified in this work as *S. infantarius* subsp. *infantarius*, stood out amongst the other strains by displaying the broadest and strongest anti-pneumococcal spectrum. *S. infantarius* LP90 growth, culture pH and, especially, anti-pneumococcal bacteriocin production were differently influenced by the tested growth media. With regard to this, influence of the media composition on bacteriocin production is well-known (Mataragas *et al.*, 2004; Zalán *et al.*, 2005; Basanta *et al.*, 2008). Anti-pneumococcal bacteriocin activity was detected in MRS broth, and, to a lesser extent, in GM17 broth. Some studies have also reported the optimal influence of MRS broth on bacteriocin production (Todorov and Dicks, 2004; Basanta *et al.*, 2008). Moreover, the maximum anti-pneumococcal bacteriocin activity (120 BU/ml) was found in MRS broth under aerobic conditions at the stationary phase (10-12 h), in agreement with other studies showing that bacteriocins reach their highest concentrations at the late logarithmic phase or the beginning of the stationary phase (Parente and Hill, 1992; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Franz *et al.*, 1996; Criado *et al.*, 2006). On the other hand, the anti-pneumococcal compound of *S. infantarius* LP90 withstood heat treatments at 100°C and displayed a high pH-stability (pH 4.4 to 8.0); however, the anti-pneumococcal activity partially disappeared after treatment with proteolytic enzymes (proteinase K and pepsine), but was not affected by lipolytic and glycolytic enzymes, which are all common characteristics of LAB bacteriocins (Cintas *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 2007; Brandão *et al.*, 2010).

S. infantarius belongs to the *Streptococcus bovis*-*Streptococcus equinus* group, which comprises commensal non-β haemolytic inhabitants of the gastrointestinal tract of animals and humans (Poyart *et al.*, 2002; Schlegel *et al.*, 2003). This species has been isolated from dairy products (Abdelgadir *et al.*, 2008; Wullschleger, 2009), where it seems to fulfil the function of

S. thermophilus (Jan *et al.*, 2012), fermented cereal beverages (Mukisa *et al.*, 2012), frozen peas, faeces of infants, and clinical samples from patients suffering from endocarditis (Hoshino *et al.*, 2005; Schlegel *et al.*, 2000). This species was included amongst the microorganisms authorized for use in animal feed in the European Union (EU) under the Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. With regard to this, *S. infantarius* CNCM I-841 was authorized and, together with *Lactobacillus plantarum* CNCM I-840, commercialized as Adjulact 2000®, a probiotic culture for calves. Nevertheless, since the end of its authorization (17th July 2004), *S. infantarius* has not been included again in the EU Register of Feed Additives (EC No. 1831/2003 of 12th February 2014), which may be related to the identification in some strains of this species of a gene encoding the glucosyltransferase (*gtf*), the enzyme responsible for biosynthesis of the capsule-like extracellular polysaccharide which might constitute a virulence factor for humans and animals (Abdelgadir *et al.*, 2008). In this context, the *in vitro* safety of *S. infantarius* LP90 was exhaustively evaluated in this work by using a wide variety of phenotypic and genetic assays. The results from these assays showed that *S. infantarius* LP90 does not encode the glucosyltransferase enzyme or any of the previously described streptococcal and enterococcal virulence factors. On the other hand, the antibiotic susceptibility profile determined by the broth microdilution test revealed that *S. infantarius* LP90 is susceptible to ampicillin, vancomycin, erythromycin, tetracycline, clindamycin, chloramphenicol, kanamycin, gentamycin, and streptomycin according to the microbiological breakpoints established for *S. thermophilus* by EFSA (2012). No breakpoints were proposed by EFSA for penicillin, virginiamycin, neomycin, linezolid, rifampicin, ciprofloxacin, and trimethoprim. The MICs shown for penicillin, linezolid, rifampicin, ciprofloxacin and trimethoprim by *S. infantarius* LP90 were compared to those reported for *S. thermophilus* LC201, namely ≤ 0.06 , 2, 0.03, 4 and >32 , respectively (Karapetkov *et al.*, 2011). According to this, *S. infantarius* LP90 shows the same MIC for penicillin as *S. thermophilus* LC201, and lower values for linezolid, ciprofloxacin and trimethoprim than *S. thermophilus* LC201. Only the MIC obtained for rifampicin was higher than the value displayed by *S. thermophilus* LC201. Therefore, *S. infantarius* LP90 shows a similar antibiotic susceptibility profile to *S. thermophilus*, a safe species used as starter culture for dairy products such as yoghurt and cheese (Hols *et al.*, 2005; Delorme, 2008; Prajapati *et al.*, 2013). The safety assessment of *S. infantarius* LP90 also included the study of biogenic amine production, as well as other potentially detrimental enzymatic activities such as β -glucuronidase activity, mucin degradation, and bile salt deconjugation. In this respect, LAB can be involved in the production of biogenic amines in fermented foods which might constitute a public health risk (Silla, 1996; Muñoz-Atienza *et al.*, 2011); however, the results obtained from the phenotypic and genetic assays revealed that *S. infantarius* LP90 does not produce any of the tested biogenic amines. On the other hand, β -glucuronidase activity has been associated with the generation of potential carcinogenic metabolites (Heavey and Rowland, 2004), while excessive degradation of mucin may facilitate the translocation of bacteria to extraintestinal tissues (Ruseler-van Embden

et al., 1995). Likewise, although the ability of probiotics to deconjugate bile salts has been usually considered as a beneficial trait, this is now questioned since large amounts of deconjugated bile salts and/or the secondary bile acids resulting from their subsequent modification (dehydroxylation) may have harmful effects for the human host (*e.g.*, impairment of fatty acid and monoglyceride digestion, DNA damage, colon cancer promotion, or alteration of the colon mucosal function leading to diarrhea or inflammation) (Begley *et al.*, 2005, 2006). Interestingly, *S. infantarius* LP90 did not exhibit β -glucuronidase, mucinolytic, or bile salt deconjugation activities.

The anti-pneumococcal activity exerted by *S. infantarius* LP90 is due to the secretion of a new bacteriocin termed infantaricin A (InfA). To date, several bacteriocins have been described within the *S. bovis* group: (i) bovicin 255, produced by *S. gallolyticus* LRC0255, which has very similar characteristics to those of class II bacteriocins (Whitford *et al.*, 2001); (ii) bovicin HC5, a lantibiotic produced by *S. bovis* HC5 (Mantovani *et al.*, 2002); (iii) macedocin, a lantibiotic produced by *S. macedonicus* ACA-DC198 (Georgalaki *et al.*, 2002); (iv) bovicin HJ50, a lantibiotic produced by *S. bovis* HJ50 (Xiao *et al.*, 2004); (v) a bacteriocin produced by *S. bovis* J2 40-2 (Rashid *et al.*, 2009), and (vi) macedovicin, a lantibiotic produced by *S. macedonicus* ACA-DC198 (Georgalaki *et al.*, 2013). However, InfA is the first identified and partially characterized bacteriocin produced by the species *S. infantarius*. Lantibiotics, characterized by containing a number of posttranslational modifications that include dehydration of serine and threonine amino acid residues to form 2,3-dehydroalanine (Dha) and 2,3-dehydrobutyrine (Dhb), respectively (Nes *et al.*, 2007), are the most common bacteriocins produced by streptococci. However, N-terminal amino acid sequencing of InfA indicated that this thermo-stable and pH-stable bacteriocin does not belong to the lantibiotic group, being tentatively included within the non pediocin-like class II bacteriocins.

In conclusion, the LAB strain of dairy origin *S. infantarius* LP90 lacks potential detrimental health effects and produces a novel bacteriocin displaying a broad anti-pneumococcal spectrum and other interesting characteristics as an alternative or complementary strategy to antibiotics for the control of human infections caused by *S. pneumoniae*.

III.6. REFERENCES

- Abdelgadir, W., D. S. Nielsen, S. Hamad, and M. Jakobsen. 2008. A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *Int. J. Food Microbiol.*, 127: 215-219.
- Assaad, U., I. El-Masri, J. Porhomayon, and A. A. El-Solh. 2012. Pneumonia immunization in older adults: review of vaccine effectiveness and strategies. *Clin. Interv. Aging.*, 7: 453-461.
- Barricarte, A., J. Castilla, A. Gil-Setas, L. Torroba, J. A. Navarro-Alonso, F. Irisarri, and M. Arriazu. 2007. Effectiveness of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine: a population-based case-control study. *Clin. Infect. Dis.*, 44: 1436-1441.

- Basanta, A., J. Sánchez, B. Gómez-Sala, C. Herranz, P. E. Hernández, and L. M. Cintas.** 2008. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer- spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *Int. J. Food Microbiol.*, 31: 293-307.
- Begley, M., C. G. M. Gaha, and C. Hill.** 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 625-651.
- Begley, M., C. Hill, and C. G. Gahan.** 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1729-1738.
- Benninger, M. S. and R. Manz.** 2010. The impact of vaccination on rhinosinusitis and otitis media. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 10: 411-418.
- Birri, D. J., D. A. Brede, and I. F. Nes.** 2011. Salivaricin D, a novel intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from healthy infant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 402-410.
- Bover-Cid, S. and W. H. Holzapfel.** 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.*, 53: 33-41.
- Braido, F., M. Bellotti, A. De Maria, M. Cazzola, and G. W. Canonica.** 2008. The role of pneumococcal vaccine. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 21: 608-615.
- Brandão, A., T. Almeida, E. Muñoz-Atienza, C. Torres, G. Igrejas, P. E. Hernández, L. M. Cintas, P. Poeta, and C. Herranz.** 2010. Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch. Microbiol.*, 192: 927-936.
- Brumfitt, W., M. R. Salton, and J. M. Hamilton-Miller.** 2002. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50: 731-734.
- Burton, J. P., P. A. Wescombe, C. J. Moore, C. N. Chilcott, and J. R. Tagg.** 2006. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 3050-3053.
- Casaus, P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287-2294.
- Chilcott, C. N. and J. R. Tagg.** 2005. US Patent Application No: 2005/0079, 597.
- Cho, E. Y., H. M. Kang, J. Lee, J. H. Kang, E. H. Choi, and H. J. Lee.** 2012. Changes in serotype distribution and antibiotic resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from children in Korea, after optional use of the 7-valent conjugate vaccine. *J. Korean Med. Sci.*, 27: 716-722.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643-2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321-4330.

- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes, and L. S. Håvarstein. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180: 1988-1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806-6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*, 7: 281-305.
- Citti, R. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 1-20.
- Coton, M., E. Coton, P. Lucas, and A. Lonvaud. 2004. Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.*, 21: 125-130.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. 2005a. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 6: 61-75.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 777-788.
- Cotter, P. D., R. P. Ross, and C. Hill. 2013. Bacteriocins- a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.*, 11: 95-105.
- Criado, R., J. Gutiérrez, M. Martín, C. Herranz, P. E. Hernández, and L. M. Cintas. 2006. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7634-7643.
- De Wals, P., L. Erickson, B. Poirier, J. Pépin, and M. E. Pichichero. 2009. How to compare the efficacy of conjugate vaccines to prevent acute otitis media? *Vaccine*, 27: 2877-2883.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16: 1058-1071.
- Delorme, C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 274-277.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans, and J. Hugenholtz. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69: 193-202.
- Dockrell, D. H., M. K. Whyte, and T. J. Mitchell. 2012. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest*, 142: 482-491.
- Drapper, L. A., K. Grainger, L. H. Deegan, P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross. 2009. Cross-immunity and immune mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lactacin 3147. *Mol. Microbiol.*, 71: 1043-1054.

- Eaton, T. and M. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1628-1635.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobial of human and veterinary importance. *EFSA J.*, 10: 2740.
- Eskola, J., T. Kilpi, A. Palmu, J. Jokinen, J. Haapakoski, E. Herva, H. Käyhty, P. Karma, R. Kohberger, G. Siber, and P. H. Mäkelä.** 2001. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N. Engl. J. Med.*, 344: 403-409.
- European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) N° 1831/2003.** Appendixes 3e& 4I. Annex I: List of Additives. Edition 185. Health and Consumers Directorate General. Directorate G-Veterinary and International Affairs. Unit G1 Animal Nutrit. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf. Fecha de consulta: junio de 2015.
- Franz, C. M., U. Schillinger, and W. H. Holzapfel.** 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 255-270.
- Franz, C. M., A. Grube, A. Herrmann, H. Abriouel, J. Starke, A. Lombardi, B. Tauscher, and W. H. Holzapfel.** 2002. Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2550-2554.
- Franz, C. M., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 293-310.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López, and N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120: 51-70.
- Galvin, M., C. Hill, and R. P. Ross.** 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28: 355-358.
- García-Moruno, E., A. V. Carrascosa, and R. Muñoz.** 2005. A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *J. Food Protect.*, 68: 625-629.
- Georgalaki, M. D., E. van den Berghe, D. Kritikos, B. Devreese, J. Van Beeumen, G. Kalantzopoulos, L. De Vuyst, and E. Tsakalidou.** 2002. Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5891-5903.
- Georgalaki, M., K. Papadimitriou, R. Anastasiou, B. Pot, G. Van Driessche, B. Devreese, and E. Tsakalidou.** 2013. Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food Microbiol.*, 33:124-130.
- Gillor, O. and L. Ghazaryan.** 2007. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 2: 115-122.

- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall, and D. B. Clewell.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.*, 176: 7335-7344.
- Goldstein, B. P., J. Wei, K. Greenberg, and R. Novick.** 1998. Activity of nisin against *S. pneumoniae*, *in vitro*, and in a mouse infection model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42: 277-278.
- Gómez-Sala, B.** 2013. Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino: caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de *Lactobacillus curvatus* BCS35. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- Gravesen, A., K. Soresen, F. M. Aarestrup, and S. Knoche.** 2001. Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. *Microb. Drug Resist.*, 7:127-135.
- Hausdorff, W. P., J. Bryant, C. Kloek, P. R. Paradiso, and G. R. Siber.** 2000. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin. Infect. Dis.*, 30: 122-140.
- Healy, B., D. Field, P. M. O'Connor, C. Hill, P. D. Cotter, and R. P. Ross.** 2013. Intensive mutagenesis of the nisin hinge leads to the rational design of enhanced derivatives. *PLoS One*, 8: e79563.
- Heavey, P. M. and I. R. Rowland.** 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Gastrointestinal cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 18: 323-336.
- Hickey, R., D. Twomey, R. Ross, and C. Hill.** 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiol.*, 149: 655-664.
- Holo, H., O. Nissen, and I. F. Nes.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, 173: 3879-3887.
- Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S. Dusko Ehrlich, E. Guédon, V. Monnet, P. Renault, and M. Kleerebezem.** 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 435-463.
- Hoshino, T., T. Fujiwara, and M. Kilian.** 2005. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 6073-6085.
- Jans, C., R. Follador, C. Lacroix, L. Meile, and M. J. A. Stevens.** 2012. Complete genome sequence of the African dairy isolate *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain CJ18. *J. Bacteriol.*, 194: 2105-2106.
- Karapetkov, N., R. Georgieva, N. Rumyan, and E. Karaivanova.** 2011. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. *Benef. Microbes*, 2: 335-339.
- Kim, T. S., J. W. Hur, M. A. Yu, C. I. Cheigh, K. N. Kim, J. K. Hwang, and Y. R. Pyun.** 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 66: 3-12.
- Le Jeune, C., A. Lonvaud-Funel, B. ten Brink, H. Hofstra, and J. M. van der Vossen.** 1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 316-326.

- Mantovani, H. C., H. Hu, R. W. Worobo, and J. B. Russell.** 2002. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *Microbiol.*, 148: 3347-3352.
- Maragkoudakis, P. A., M. Papadelli, M. Georgalaki, E. G. Panayotopoulou, B. Martinez-Gonzalez, A. F. Mentis, K. Petraki, D. N. Sgouras, and E. Tsakalidou.** 2009. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Int. J. Food Microbiol.*, 133: 141-147.
- Marcobal, A., B. de la Rivas, M. V. Moreno-Arribas, and R. Muñoz.** 2005. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Prot.*, 68: 874-878.
- Mataragas, M., E. H. Drosinos, E. Tsakalidou, and J. Metaxopoulos.** 2004. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85: 191-198.
- McGee, L., L. McDougal, J. Zhou, B. G. Spratt, F. C. Tenover, R. George, R. Hankenbeck, W. Hryniewicz, J. C. Lefèvre, A. Tomasz, and K. P. Klugman.** 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by pneumococcal molecular epidemiology network. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 2565-2571.
- Moffitt, K. L. and R. Malley.** 2011. Next generation pneumococcal vaccines. *Curr. Opin. Immunol.*, 23: 407-413.
- Mokaddas, E. M., V. O. Rotimi, and M. J. Albert.** 2008. Implications of *Streptococcus pneumoniae* penicillin resistance and serotype distribution in Kuwait for disease treatment and prevention. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15: 203-207.
- Montalbán-López, M., M. Sánchez-Hidalgo, E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, and M. Maqueda.** 2011. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 12:1205-1220.
- Moreira, W. L.** 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp.347, de origen cárnico. Ph.D. Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Mukisa, I. M., D. Porcellato, Y. B. Byaruhanga, C. M. Muyanja, T. Langsrud, and J. A. Navhus.** 2012. The dominant microbial community associated with fermentation of Obushera (sorghum and millet beverages) determined by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 160: 1-10.
- Muñoz-Atienza, E., G. Landeta, B. de las Rivas, B. Gómez-Sala, R. Muñoz, P. E. Hernández, L. M. Cintas, and C. Herranz.** 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 146: 212-216.
- Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189: 1189-1198.
- Noriega, L., I. Cuevas, A. Margolles, and C. G. de los Reyes-Gavilán.** 2006. Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *Int. Dairy J.*, 16: 850-855.
- Papagianni, M.** 2003. Ribosomally, synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and application. *Biotechnol. Adv.*, 21: 465-499.

- Parente, E. and C. Hill.** 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *E. faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 55: 497-502.
- Piper, C., P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill.** 2009a. Discovery of medically significant lantibiotics. *Curr. Drug Discov. Technol.*, 6: 1-18.
- Piper, C., L. A. Draper, P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill.** 2009b. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J. Antimicrob. Chemother.*, 64: 546-551.
- Poyart, C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 41-47.
- Poyart, C., G. Quesne, and P. Trieu-Cuot.** 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1247-1255.
- Prajapati, J. B., N. M. Nathani, A. K. Patel, S. Senan, and C. G. Joshi.** 2013. Genomic analysis of dairy starter culture *Streptococcus thermophilus* MTCC5461. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 459-466.
- Rashid, Md. H., K. Togo, M. Ueda, and T. Miyamoto.** 2009. Characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* J2 40-2 isolated from traditional fermented milk "Dahi". *Anim. Sci. J.*, 80: 70-78.
- Rea, M. C., R. P. Ross, P. D. Cotter, and C. Hill.** 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In "*Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*", pp. 29-53. Drider D. and S. Rebuffat (Eds.). Springer, New York, USA.
- Rightmier, E., V. Stevens, and J. Brown.** 2011. *Streptococcus pneumoniae* vaccination in older adults. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.*, 9: 392-404.
- Riley, M. A. and J. E. Wertz.** 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 117-137.
- Rodgers, G. L., A. Arguedas, R. Cohen, and R. Dagan.** 2009. Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 27: 3802-3810.
- Ruseler-van Embden, J. G. H., L. M. C. Lieshout-van, M. J. Gosselink, and P. Marteau.** 1995. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand. J. Gastroenterol.*, 30: 675-680.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross, and C. Hill.** 1998. Evaluation of lactacin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2287-2290.
- Sánchez, J., D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2007. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.*, 270: 227-236.
- Schlegel L., F. Grimont, M. D. Collins, B. Relgnault, P. A. D. Grimont, and A. Bouvet.** 2000. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 1425-1434.

- Schlegel, L., F. Grimont, E. Ageron, P. A. D. Grimont, and A. Bouvet. 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 631-645.
- Schuerman, L., D. Borys, B. Hoet, A. Forsgren, and R. Prymula. 2009. Prevention of otitis media: now a reality? *Vaccine*, 27: 5748-5754.
- Severina, E., A. Severina, and A. Tomasz. 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41: 341-347.
- Silla, M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 213-231.
- Sparo, M. D., D. G. Jones, and S. F. Sánchez Bruni. 2009. Assessment of the *in vitro* efficacy of the novel antimicrobial peptide CECT7121 against human gram-positive bacteria from serious infections refractory to treatment. *Chemotherapy*, 55: 270-277.
- Stern, N. J., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, L. I. Volodina, Y. N. Kovalev, T. Y. Kudryavtseva, V. V. Perelygin, V. D. Pokhilenko, V. P. Levchuk, V. N. Borzenkov, O. E. Svetoch, E. V. Mitsevich, and I. Mitsevich. 2005. US Patent Application No: 2005/0153, 881.
- Sun, Z., J. Zhong, X. Liang, J. Liu, X. Chen, and L. Huan. 2009. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 1964-1973.
- Tagg, J. R., K. P. Dierksen, and M. Upton. 2004. US Patent Application No: 2004/0232, 205.
- Tagg, J. R., C. N. Chilcott, and J. P. Burton. 2006. US Patent Application No: 2006/0171, 901.
- Todorov, S. D. and L. M. Dicks. 2004. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *J. Basic. Microbiol.*, 44: 305-316.
- Torri Tarelli, G., D. Carminati, and G. Giraffa. 1994. Production of bacteriocin active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a dairy enterococci. *Food Microbiol.*, 11: 243-252.
- Trappetti, C., E. van der Maten, Z. Amin, A. J. Potter, A. Y. Chen, P. M. van Mourik, A. J. Lawrence, A. W. Paton, and J. C. Paton. 2013. Site of isolation determines biofilm formation and virulence phenotypes of serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.*, 81: 505-513.
- Urueña, A., T. Pippo, M. S. Betelu, F. Virgilio, N. Giglio, A. Gentile, S. García Jiménez, B. Jáuregui, A. D. Clark, M. Diosque, and C. Vizzotti. 2011. Cost-effectiveness analysis of the 10- and 13- valent pneumococcal conjugate vaccines in Argentina. *Vaccine*, 29: 4963-4972.
- Van Bambeke, F., R. R. Reinert, P. C. Appelbaum, P. M. Tulkens, and W. E. Peetermans. 2007. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections. Current and future therapeutic options. *Drugs*, 67: 2355-2382.
- Vankerckhoven, V., T. Van Autgaerden, C. Vael, C. Lammens, S. Chapelle, R. Rossi, D. Jabes, and H. Goossens. 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 4473-4479.
- Webster, J., E. Theodoratou, H. Nair, A. C. Seong, L. Zgaga, T. Huda, H. L. Johnson, S. Madhi, C. Rubens, J. S. F. Zhang, S. El Arifeen, R. Krause, T. A. Jacobs, A. W. Brooks, H. Campbell, and

- I. Rudan.** 2011. An evaluation of emerging vaccines for childhood pneumococcal pneumonia. *BMC Public Health.*, 11: S26.
- Weil-Olivier, C., M. van der Linden, I. de Schutter, R. Dagan, and L. Mantovani.** 2012. Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: a European perspective. *BMC Infect. Dis.*, 12: 207.
- Wescombe, P. A., N. CK. Heng, J. P. Burton, C. N. Chilcott, and J. R. Tagg.** 2009. Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Microbiol.*, 4: 819-835.
- Whitford, M. F., M. A. McPherson, R. J. Forster, and R. M. Teather.** 2001. Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 569-574.
- Wullschleger, S.** 2009. Biodiversity and microbial safety of artisanal Malian sour milk fènè and development of adapted starter cultures for controlled production. PhD thesis. ETH Zurich, Zurich, Switzerland.
- Xiao, H., X. Chen, M. Chen, S. Tang, X. Zhao, and L. Huan.** 2004. Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*, 150: 103-108.
- Yuzenkova, J., M. Delgado, S. Nechaev, D. Savalia, V. Epshtein, I. Artsimovitch, R. A. Mooney, R. Landick, R. N. Farias, R. Salomon, and K. Severinov.** 2002. Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. *J. Biol. Chem.*, 277: 50867-50875.
- Zalán, Z., E. Németh, A. Baráth, and A. Halász.** 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotechnol.*, 43: 219-225.
- Zhou, J. S., P. K. Gopal, and H. S. Gill.** 2001. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*. *Int. J. Food Microbiol.*, 63: 81-90.

CAPÍTULO IV

Análisis genético y transcripcional de un *cluster*
multibacteriocinogénico de la cepa
antineumocócica de origen lácteo
Streptococcus infantarius LP90

CHAPTER IV

*Genetic and transcriptional analyses of a
multibacteriocinogenic cluster from the
anti-pneumococcal dairy strain
Streptococcus infantarius LP90*

IV.1. ABSTRACT

Infantaricin A₁ (InfA₁), originally termed infantaricin A (InfA) (Chapter III), is an anti-pneumococcal bacteriocin produced by *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* LP90, a strain isolated from water-buffalo milk. In this work, we describe that the gene encoding InfA₁ (*infA₁*) is located in a 17,730-bp multibacteriocinogenic cluster consisting of 29 open reading frames (ORFs). This cluster includes 12 genes putatively encoding 7 class II-bacteriocins, namely 5 two-peptide (InfA, InfB, InfC, InfD and InfG) and two one-peptide (InfE and InfF) bacteriocins, and 17 genes encoding proteins involved in their secretion, immunity and regulation. Transcriptional analysis of this multibacteriocinogenic cluster revealed that all genes are transcribed except those involved in the regulation of bacteriocin production. Furthermore, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis of the antimicrobial peptides purified to homogeneity from the cell-free supernatants (CFS) of *S. infantarius* LP90 cultures showed that, in addition to the anti-pneumococcal InfA₁, at least four more bacteriocins, which do not show antimicrobial activity against *S. pneumoniae*, are secreted by this strain. Interestingly, the molecular mass of purified InfA₁ (3,963 Da), which displays anti-pneumococcal activity, does not match that predicted from its deduced amino acid sequence (3,357 Da). However, *S. infantarius* LP90 also secretes a peptide showing a molecular mass of 3,357 Da which does not exert anti-pneumococcal activity.

IV.2. INTRODUCTION

Bacteriocins are ribosomally-synthesized antimicrobial peptides produced by Lactic Acid Bacteria (LAB) and other bacteria. Bacteriocins produced by LAB may be categorized into three classes. Class I consists of bacteriocins (often referred to as lantibiotics) that contain one or more of the modified amino acid residues lanthionine, β -methyllanthionine, dehydroalanine, dehydrobutyrine, and/or D-alanine. This class can be further divided into two subclasses according to the structural characteristics of the bacteriocins: type A, which contains elongated molecules with a flexible structure in solution, and type B, with a more rigid and globular structure. Likewise, class II, which consists of non-modified, small, heat-stable peptides, may be divided into five subclasses: (i) IIa, containing the anti-listerial, one-peptide, pediocin-like bacteriocins that share a consensus sequence motif (YGNGVXC) at their amino terminus; (ii) IIb, including the two-peptide bacteriocins; (iii) IIc, consisting of leaderless peptide bacteriocins; (iv) IId, comprising circular bacteriocins, and (v) IIE, containing other peptide bacteriocins. Finally, class III consists of large and heat-labile protein bacteriocins (Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2010).

Production of most class II bacteriocins relies on a well-conserved genetic organization including, at least, four genes which may, or may not, be located on the same transcription unit.

These genes are usually organized in one or two operon-like structures, including: (i) the structural gene/s encoding the prebacteriocin/s biologically inactive precursor/s containing an N-terminal extension of 15-30 or 18-30 amino acid residues (the so-called double-glycine [GG]-type leader sequence or Sec-type signal peptide, respectively); (ii) the gene encoding the dedicated immunity protein/s, which confers producer self-protection against the toxicity of the bacteriocin/s, and (iii) in the case of the bacteriocins synthesized with a GG-type leader sequence, the gene encoding a dedicated ATP-binding cassette (ABC) transporter required for processing and transport of the bacteriocin, and a gene encoding an accessory protein needed for proper bacteriocin externalization (Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003). Additionally, in some bacteriocin clusters, the production of class II bacteriocins is under control of a dedicated three-component regulatory system which acts as a quorum sensing (QS) mechanism consisting of the genes encoding: (i) an induction factor (IF), which also contains the typical double-glycine cleavage site that allows it to be processed and exported through the bacteriocin ABC-transporter and accessory protein, (ii) an histidine protein kinase (HPK), and (iii) a response regulator (RR) (Nes *et al.*, 1996; Nes and Eijsink, 1999). The HPK senses the presence of the peptide outside the cell and transmits the signal over the membrane to the RR, which in turn activates transcription of the target genes.

In streptococci, lantibiotics are the most frequently produced bacteriocins (Nes *et al.*, 2007), including, among others: (i) salivaricin A and its variants (SalA2 to SalA5) (Ross *et al.*, 1993; Tagg, 2004; Wescombe *et al.*, 2006) and salivarin B (Tagg, 2004) produced by *Streptococcus salivarius*; (ii) mutacin I (Qi *et al.*, 2000), mutacin II (Chikindas *et al.*, 1995), mutacin N (Balakrishnan *et al.*, 2000), mutacin B-Ny266 (Mota-Meira *et al.*, 1997), and mutacin III (mutacin 1140) (Hillman *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 1999) produced by *Streptococcus mutans*; (iii) macedocin (Georgalaki *et al.*, 2002) and macedovicin (Georgalaki *et al.*, 2013) produced by *Streptococcus macedonicus*; (iv) bovicin HJ50 produced by *Streptococcus bovis* (Xiao *et al.*, 2004), and (v) nisin U produced by *Streptococcus uberis* (Wirawan *et al.*, 2006). However, bacteriocins belonging to class II have also been described in streptococci, such as: (i) bovicin 255 produced by *S. bovis* belonging to the subclass IIe (Whitford *et al.*, 2001); (ii) thermophilin 13 produced by *Streptococcus thermophilus* (Marciset *et al.*, 1997) and mutacin IV produced by *S. mutans* (Qi *et al.*, 2001), both belonging to the subclass IIb, and (iii) the subclass IIc bacteriocin BHT-B produced by *Streptococcus rattus* (Hyink *et al.*, 2005). There are other reports of putative bacteriocins produced by streptococci which either do not provide a complete bacteriocin characterization or are only supported by gene annotation. In this respect, a high number of genes from *Streptococcus* spp. genome sequences have been proposed to encode bacteriocin-like peptides (Nes *et al.*, 2007). Accordingly, detailed *in silico* analysis of the *S. pneumoniae* genome sequence revealed the presence of seven bacteriocin-like peptide genes (*blp_{sp}*) (*blpIJK*, *blpMNO*, and *blpU*) encoding peptides with the Gly-Gly motif characteristic of class II bacteriocins which are secreted by ABC transporters and showing homology to subclass IIb bacteriocins (De Saizieu *et al.*, 2000). Likewise, analysis of the

S. mutans genome sequence revealed a Blp-like bacteriocin system (*bsm* locus) containing ten small open reading frames (ORFs) encoding putative class II bacteriocins that they might belong to the subclass IIb (Van der Ploeg, 2005). Finally, the *blp* locus, identified in the genome of the sequenced *S. thermophilus* LMD-9 (*blp_{St}*), is characterized by the presence of four ORFs encoding putative peptides sharing several characteristics with subclass IIb bacteriocins (Fontaine *et al.*, 2007).

In Chapter III, we reported that *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* LP90, isolated from water-buffalo milk (Citti, 2005), is a putatively safe strain which secretes infantaricin A (InfA), an anti-pneumococcal class II bacteriocin which constitutes the first described and partially characterized bacteriocin produced by this species. In this work, we present the genetic and transcriptional analyses of a multibacteriocinogenic gene cluster (17,730-bp) located in this streptococcal strain containing the gene encoding InfA.

IV.3. MATERIALS AND METHODS

VI.3.1. Bacterial strains and culture conditions

Unless otherwise stated, *S. infantarius* LP90 and *Pediococcus damnosus* CECT4797 were grown aerobically in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 37 and 30 °C, respectively, for 16 h. *Streptococcus pneumoniae* 66405 was first inoculated in Columbia agar plates supplemented with horse blood (5%, w/v) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated under aerobic conditions at 37 °C overnight. Subsequently, a loop of bacterial mass was taken from the surface of these plates and transferred to Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid), and incubated under the same conditions for approximately 6 h (OD₆₀₀ of 0.5).

VI.3.2. DNA isolation and nucleotide sequencing

Total DNA from *S. infantarius* LP90 was isolated using the Wizard Genomic DNA Purification Kit as recommended by the manufacturer (Promega Corp.; Madison, Wisconsin, USA). Specific oligonucleotide primers (Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, United Kingdom) designed according to the nucleotide sequence of *S. infantarius* ATCC BAA-102 (Genbank accession no. ABJK02000019) and to the progressively obtained nucleotide sequence of *S. infantarius* LP90 were used for obtaining the nucleotide sequence of the multibacteriocinogenic gene cluster located in the *S. infantarius* LP90 genome. Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures containing 100 ng of purified DNA, 70 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), and 1 U of Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (94 °C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 15 sec), annealing (at an

appropriate temperature for 30 sec), and elongation (68 °C for 30 sec to 1 min), ending with a final extension step at 68 °C for 7 min in an Eppendorf Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). PCR products were analyzed by electrophoresis through agarose (1-2%, w/v) (Pronadisa, Madrid, Spain) gels stained with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA) and visualized with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). The molecular size markers used were HyperLadder II (Biolone London, United Kingdom) and 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen). The PCR-generated fragments were purified with the Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Service of Parque Científico-UCM (Madrid, Spain). Nucleotide sequence analysis was performed using the ORF-finder (National Center for Biotechnological Information [NCBI], US National Library of Medicine [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>]) and the BLAST (NCBI [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]) tools for the prediction of ORFs and similarity searches, respectively. Likewise, the identification of *rho*-independent transcription terminators was performed using the ARNold finding terminators tool (Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud11 [<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold>]). The nucleotide sequence obtained in this work (17,730 bp) was deposited in GenBank under accession no. KJ475434.

IV.3.3. Transcriptional analysis of a multibacteriocinogenic gene cluster from *S. infantarius* LP90

Total RNA was isolated from exponentially growing *S. infantarius* LP90 cultures (OD₆₀₀ of 0.6-0.9) using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the procedure recommended by the manufacturer. The isolated RNA was treated with RNase-free DNase I (Qiagen) to thoroughly remove residual DNA. One-step reverse transcription (RT)-PCR was performed with the Access RT-PCR System (Promega) using the DNase-treated RNA as template for cDNA synthesis. Specific primers designed according to the localization of promoter and transcription termination regions found in the nucleotide sequence of *S. infantarius* LP90 (17,730 bp) were obtained from Sigma-Genosys Ltd. RT-PCR amplifications were carried out in 50 µl mixtures containing 1 µl of Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV-RT) (5u/µl), 1 µl of *Tfl* DNA polymerase (5u/µl), 10 µl of 5× AMV/*Tfl* reaction buffer, 1µl of dNTPs (10 mM), 0.7µl of primers (50 pmol), 2 µl of MgSO₄ (25 mM), and 150 ng/µl of purified RNA in an Eppendorf Mastercycler thermal cycler. For first strand cDNA synthesis, RT-PCR mixtures were subjected to an initial cycle of reverse transcription (45 °C for 45 sec) followed by AMV-RT inactivation and RNA/cDNA denaturation (94 °C for 2 min). For second strand synthesis and PCR amplifications, the following conditions were used: denaturation (94 °C for 30 sec), annealing (at an appropriate temperature for 1 min), and elongation (68 °C for 2 min) for 40 cycles, ending with a final extension step at 68 °C for 7 min. PCR amplifications using the DNase-treated isolated RNA as template were also performed to ensure the absence of contaminant DNA. The resulting

RT-PCR and PCR products were analyzed by electrophoresis on agarose (1.5%, w/v) gels and visualized as described above. The molecular size markers used were HyperLadder II and 1Kb Plus DNA ladder.

VI.3.4. Purification and mass spectrometry of the bacteriocins secreted by *S. infantarius* LP90

In order to detect the bacteriocins secreted by *S. infantarius* LP90, different purification procedures were employed. An overnight preculture of this strain was used to inoculate three 1 liter MRS broth bottles which were incubated at 37 °C under aerobic conditions for 12 h. After the cells were removed by centrifugation, the proteins present in the cell-free supernatants (CFSs) were subjected to precipitation with ammonium sulphate (50% [w/v] [Merck, Farma y Química S. A., Barcelona, Spain]). The solution was then stirred at 4 °C for 3 h and subsequently centrifuged ($12,000 \times g$ at 4 °C for 30 min). The pellet and floating materials obtained after centrifugation were mixed and solubilized in 200 ml of 20 mM sodium phosphate buffer (NaP) (pH 6.0) and desalted by gel filtration (PD-10 columns; GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). From this point, each of the three concentrated and desalted CFSs was subjected to a different procedure consisting in: (i) cation-exchange (HiPrep 16/10 SP XL, GE Healthcare) and reversed-phase (PepRPC HR 5/5, GE Healthcare) chromatographies, both performed in a Fast Protein Liquid Chromatography system (ÄKTA-FPLC) (GE Healthcare) (procedure P1, Chapter III); (ii) anion-exchange (CM Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) and hydrophobic-interaction (Octyl Sepharose CL-4B, Sigma-Aldrich) batch chromatographies, followed by reversed-phase chromatography in a ÄKTA-FPLC system (procedure P2), and (iii) cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) and hydrophobic-interaction batch chromatographies (procedure P3). The antimicrobial activity of the fractions obtained during the purification procedures was determined by a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000) using *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganisms. For this purpose, 50 µl of two-fold serial dilutions of the samples and 150 µl of a diluted fresh overnight culture of the indicator microorganism (approx. 4×10^5 cfu/ml) were added to each well of the microtiter plate. Growth inhibition was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtiter plate reader (Labsystems iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finland) after incubation under aerobic conditions at the appropriate temperature for 12-16 h. One bacteriocin unit (BU) was defined as the highest dilution of the sample causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). The peptides obtained from both reversed-phase chromatographies and after the hydrophobic-interaction chromatography of procedure P3 were subjected to Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis in a Voyager-DE STR mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Foster City, California, USA) at the Mass Spectrum Service of Parque Científico-UCM (Madrid, Spain).

IV.3.5. Colony mass spectrometry

The secretion of bacteriocins produced by *S. infantarius* LP90, as well as of a putative IF involved in regulation of bacteriocin production, was investigated by colony mass spectrometry (CMS) as previously described (Field *et al.*, 2012). Briefly, *S. infantarius* LP90 individual colonies from MRS agar plates were collected and mixed with 50 μ l of 2-propanol (70%, v/v) adjusted to pH 2 with HCl. The suspension was vortexed, the cells were centrifuged at $12,000 \times g$ for 2 min, and the obtained supernatant was used for analysis. For MS analyses, the sample was prepared as follows: (i) a 0.5 μ l aliquot of matrix solution (alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid, 10 mg/ml in 50% acetonitrile-0.1% [v/v] trifluoroacetic acid [TFA]) was placed onto the target and left for 1-2 min before being removed; (ii) once the residual solution had been air-dried, the sample solution was positioned onto the precoated sample spot, and (iii) a second 0.5 μ l aliquot of matrix was added on top of the sample and allowed to air-dry. Analyses were performed in an Axima CFR plus Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Shimadzu Biotech, Manchester, UK) operated in positive-ion reflectron mode at the MoorePark Research Center (Cork, Ireland).

IV.4. RESULTS

IV.4.1. Nucleotide sequence and organization of the multibacteriocinogenic gene cluster from *S. infantarius* LP90

The complete nucleotide sequence of the multibacteriocinogenic cluster present in *S. infantarius* LP90 containing the structural gene of InfA_I (*infA_I*) was determined by PCR using specific primers designed according to the nucleotide sequence of *S. infantarius* ATCCBAA-102 and the progressively obtained nucleotide sequence of *S. infantarius* LP90. Computer analysis of the nucleotide sequence obtained (17,730 bp, Fig. 4.1) revealed a 99% homology to the nucleotide sequence of *S. infantarius* ATCCBAA-102, as well as the presence of 29 putative ORFs (*orf1* to *orf29*) (Table IV.1 and Fig. 4.2) located on the same DNA strand (except *orf1*, *orf2*, and *orf29*) and preceded by putative ribosome binding sites (RBSs), except *orf14* and *orf21* (Figs. 4.1 and 4.2). According to the results of BLAST analysis, these ORFs could be grouped into three different functional regions (Fig. 4.2): (i) region I (*orf1-orf2*), related to bacteriocin/IF secretion and apparently organized in one operon; (ii) region II (*orf3* to *orf26*) involved in bacteriocin synthesis and immunity and hypothetically organized in seven operons, and (iii) region III (*orf27* to *orf29*), related to regulation of the bacteriocin production and apparently organized in two operons.

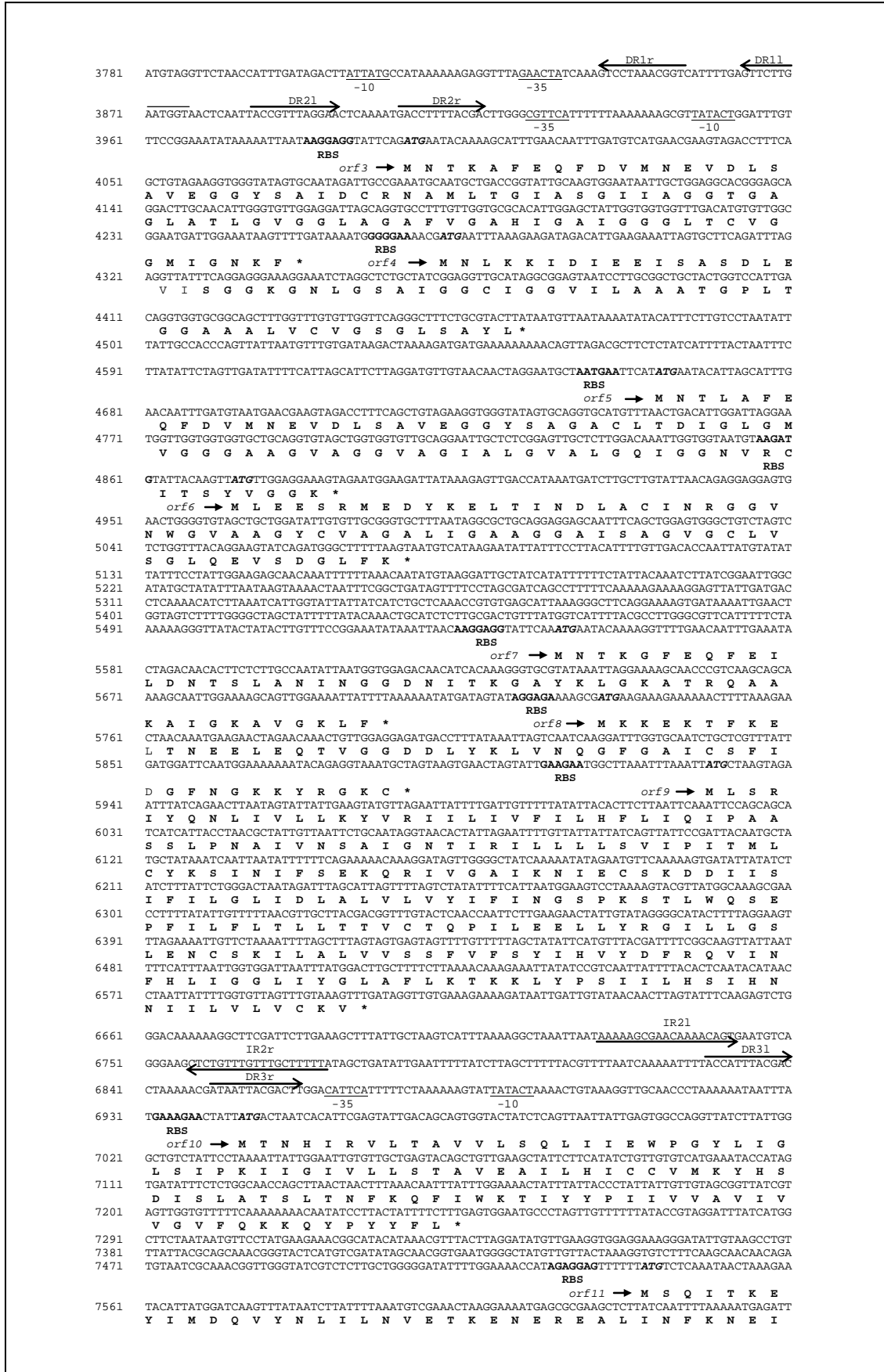


Figure 4.1. Continued.

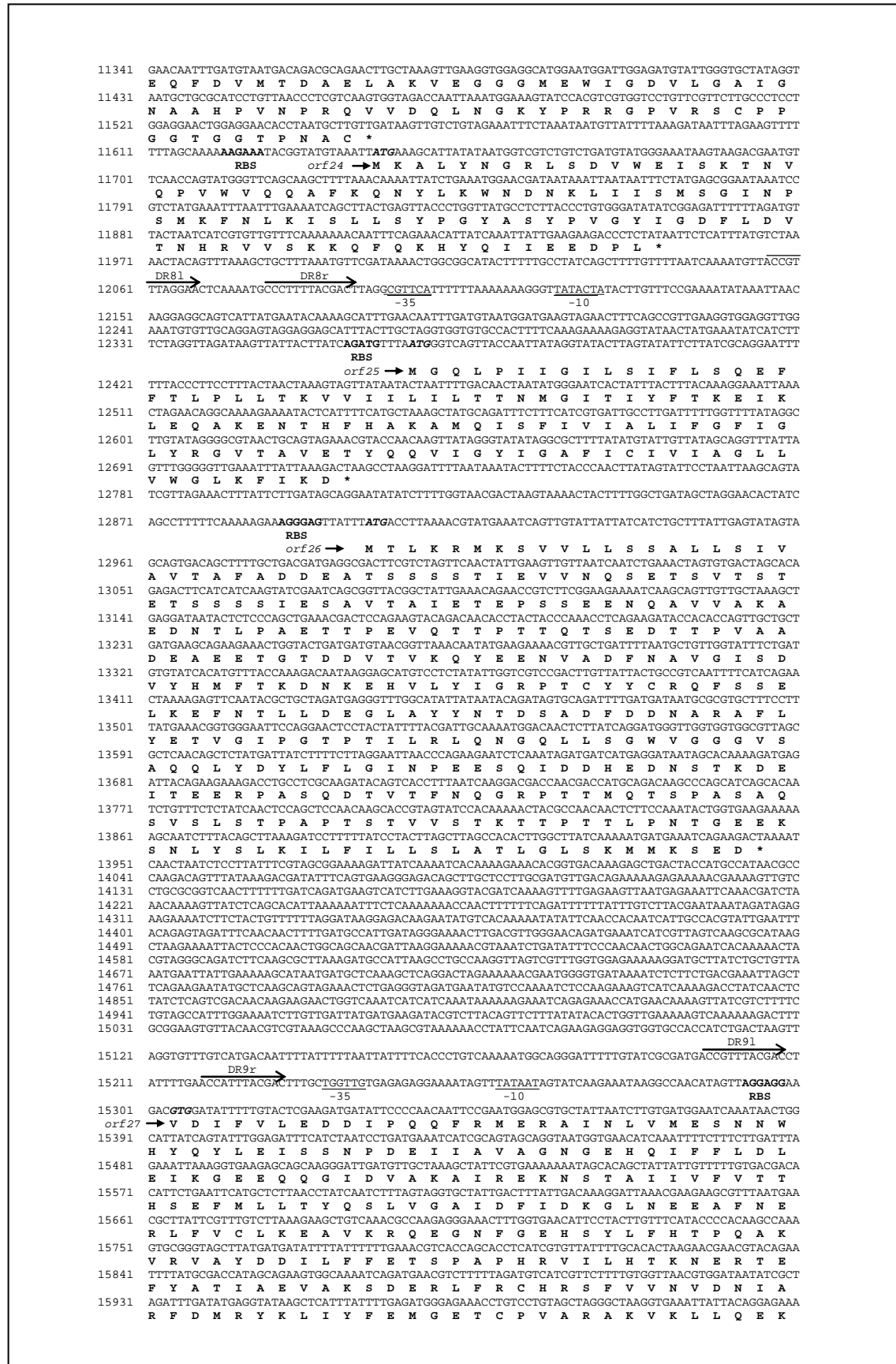


Figure 4.1. Continued.

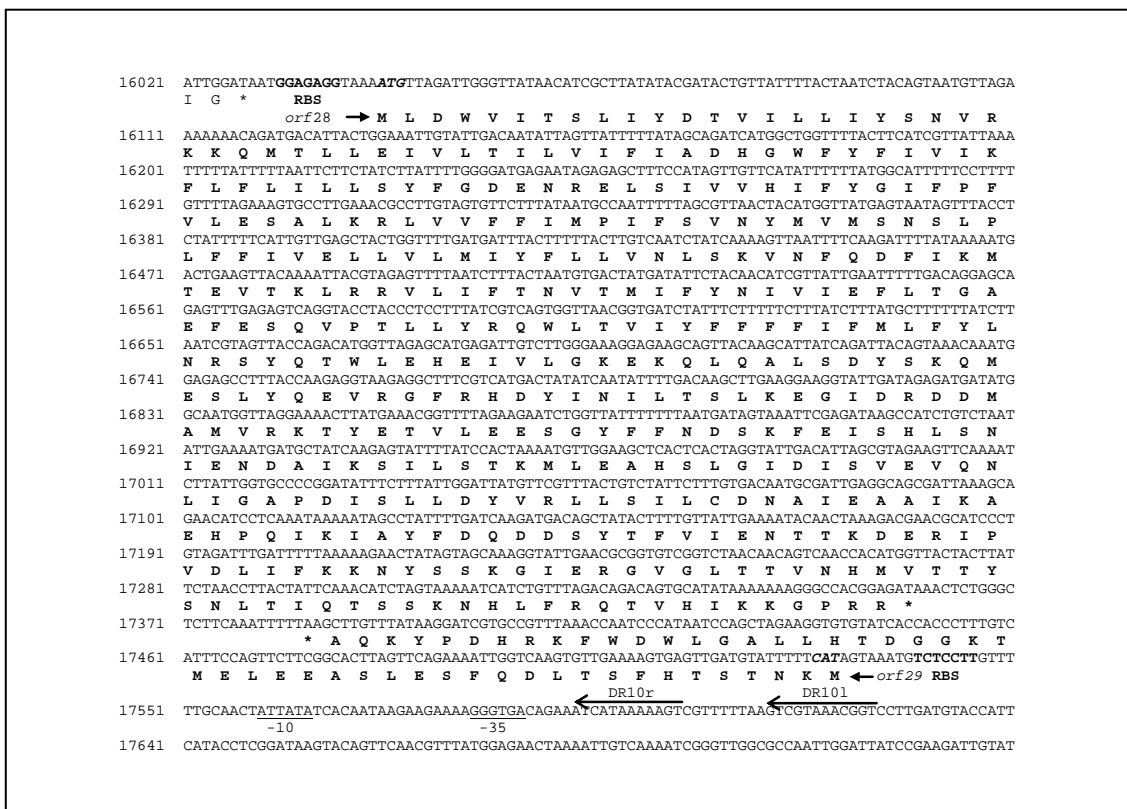


Figure 4.1. Continued.

More specifically, region I (coordinates 1-3,878) consists of two ORFs (*orf1* and *orf2*) which share a common putative promoter (P1). Upstream of the -10 promoter element, there are two direct repeats (DR1l and DR1r) spaced by 8 bp, while downstream of *orf1* there are two inverted repeats (IR1l and IR1r) (Fig. 4.1) which may function as a *rho*-independent transcriptional terminator. *orf1* and *orf2* encode putative 464- and 715-amino acid proteins, respectively, with homology to an accessory protein involved in bacteriocin secretion and a bacteriocin ABC transporter of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* TX20005 and *S. infantarius* subsp. *infantarius* CJ18, respectively (Table IV.1).

Regarding region II (coordinates 3,886-15,190), comprising 24 ORFs (*orf3* to *orf26*), it can be further divided into six sub-regions according to the localization of their hypothetical promoter and transcription termination regions (Figs. 4.1 and 4.2):

Sub-region IIa (coordinates 3,886-6,776) is integrated by 7 ORFs sharing a promoter region (P2) preceded by two direct repeat elements (DR2l and DR2r) spaced by 8 bp. More precisely *orf3*, *orf4*, *orf5* and *orf6* encode putative peptides of 85, 64 75 and 68 amino acid residues containing leader sequences of the GG-type of 23, 22, 23 and 25 amino acids, respectively, showing homology to streptococcal bacteriocins or enhancer peptides. On the other hand, *orf7* and *orf8* encode putative peptides of 52 and 51 amino acid residues, respectively, containing

leader sequences of the GG-type of 23 and 21 amino acids, respectively, showing homology to streptococcal hypothetical proteins. Finally, *orf9* encodes a putative 224-amino-acid protein showing homology to a protein of *Streptococcus pyogenes* belonging to the CAAX amino terminal protease family. Two inverted repeats (IR2l and IR2r) located 120 bp downstream of *orf9* could form a stem-loop structure which may function as a *rho*-independent transcriptional terminator.

Sub-region IIb (coordinates 6,829-7,877) is composed of 2 ORFs, *orf10* and *orf11*, which share a common putative promoter (P3) preceded by two direct repeats (DR3l and DR3r), spaced by 9 bp. *orf10* and *orf11* encode putative 100-amino acid proteins sharing homology to bacteriocin immunity proteins of *S. salivarius* JIM8777 and *S. infantarius* CJ18, respectively. Downstream of *orf11* there is an IR (IR3l and IR3r) that could serve as a *rho*-independent transcriptional terminator.

Sub-region IIc (coordinates 7,891-9,746) is integrated by 5 ORFs (*orf12-orf16*) followed by a putative *rho*-independent transcriptional terminator (IR4l and IR4r). *orf12* is preceded by a promoter region (P4) and two direct repeat elements (DR4l and DR4r) spaced by 9 bp. *orf12* and *orf13* encode putative 77 and 62-amino-acid peptides containing 23 and 19-amino acid leader sequences of the GG- type and showing homology to a streptococcal bacteriocin-like peptide and a streptococcal class IIb bacteriocin, respectively. Although not preceded by an evident RBS, *orf14* encodes a putative 71-amino-acid peptide identical to a streptococcal protein of unknown function. On the other hand, *orf15* and *orf16* share a promoter region (P5) preceded by two direct repeat elements (DR5l and DR5r) spaced by 9 bp. *orf15* encodes a 72-amino-acid peptide containing a 23-amino-acid leader sequence of the GG-type and shows homology to a streptococcal bacteriocin of the pediocin family. Finally, *orf16* encodes a putative 98-amino-acid protein with homology to a streptococcal bacteriocin immunity protein.

Sub-region IId (coordinates 9,764-11,195) consists of 6 ORFs (*orf17* to *orf22*) sharing a promoter (P6) preceded by two direct repeat elements (DR6l and DR6r) spaced by 9 bp. *orf17* encodes a putative 77-amino acid peptide containing a 23-amino-acid leader sequence of the GG-type and showing homology to a streptococcal bacteriocin. *orf18* encodes a 56-amino-acid peptide identical to a streptococcal protein of unknown. On the other hand, *orf19* and *orf20* encode 66 and 60-amino acid peptides containing 23 and 18-amino-acid leader sequences of the GG-type showing homology to streptococcal class II bacteriocins. Although not preceded by an evident RBS, *orf21*, which overlaps the end of *orf20*, encode a putative 50-amino acid peptide with homology to a streptococcal protein of unknown function. Similarly, *orf22* encodes a putative 71-amino-acid protein with homology to a streptococcal protein of unknown function. Downstream of *orf22*, a 26-bp region (IR5l and IR5r) could form a stem-loop structure which may function as a *rho*-independent transcriptional terminator.

Table IV.1. Predicted Open Reading Frames (ORFs) in the 17,730-bp fragment of genome from *S. infantarius* LP90 and the closest relationships of the deduced proteins

ORF	Gene		Protein		
	Position in nucleotide sequence	Name	Length (amino acids)	Molecular mass (kDa)	pI
ORF1	5' 1,563 3' 169	<i>orf1</i>	464	51.4	5.90
ORF2	3,722 1,574	<i>orf2</i>	715	80.1	6.70
ORF3	3,997 4,254	<i>orf3</i> (<i>infC</i> ₂)	85	8.2	4.60
ORF4	4,272 4,466	<i>orf4</i> (<i>infC</i> ₁)	64	6.0	4.50
ORF5	4,662 4,889	<i>orf5</i> (<i>infB</i> ₂)	75	7.2	4.00
ORF6	4,873 5,079	<i>orf6</i> (<i>infB</i> ₁)	68	6.9	4.30
ORF7	5,548 5,706	<i>orf7</i> (<i>infA</i> ₂)	52	5.5	9.80
ORF8	5,734 5,886	<i>orf8</i> (<i>infA</i> ₁)	51	5.8	7.70
ORF9	5,929 6,604	<i>orf9</i>	224	25.2	9.30
ORF10	6,944 7,246	<i>orf10</i>	100	11.4	9.20
ORF11	7,540 7,842	<i>orf11</i>	100	11.6	7.90
ORF12	8,000 8,233	<i>orf12</i> (<i>infD</i> ₁)	77	7.5	4.90
ORF13	8,253 8,441	<i>orf13</i> (<i>infD</i> ₂)	62	6.0	4.70
ORF14	8,721 8,936	<i>orf14</i>	71	8.4	9.10
ORF15	9,191 9,409	<i>orf15</i> (<i>infE</i>)	72	7.7	4.90
ORF16	9,409 9,705	<i>orf16</i>	98	11.3	9.40
ORF17	9,874 10,107	<i>orf17</i> (<i>infF</i>)	77	7.8	7.70
ORF18	10,112 10,282	<i>orf18</i>	56	6.8	9.80
ORF19	10,297 10,497	<i>orf19</i> (<i>infG</i> ₁)	66	6.5	6.00
ORF20	10,523 10,705	<i>orf20</i> (<i>infG</i> ₂)	60	5.8	4.30
ORF21	10,677 10,829	<i>orf21</i>	50	5.9	9.52
ORF22	10,854 11,069	<i>orf22</i>	71	8.3	8.80
ORF23	11,323 11,553	<i>orf23</i>	76	8.0	5.64
ORF24	11,642 11,951	<i>orf24</i>	103	12.0	9.30
ORF25	12,367 12,720	<i>orf25</i>	117	13.0	8.79
ORF26	12,901 13,947	<i>orf26</i>	348	37.6	4.16
ORF27	15,304 16,029	<i>orf27</i>	241	27.9	5.25
ORF28	16,042 17,351	<i>orf28</i>	439	51.4	5.85
ORF29	17,521 17,373	<i>orf29</i>	21	2.6	6.90

*Results of the similarity searches conducted on October of 2015.

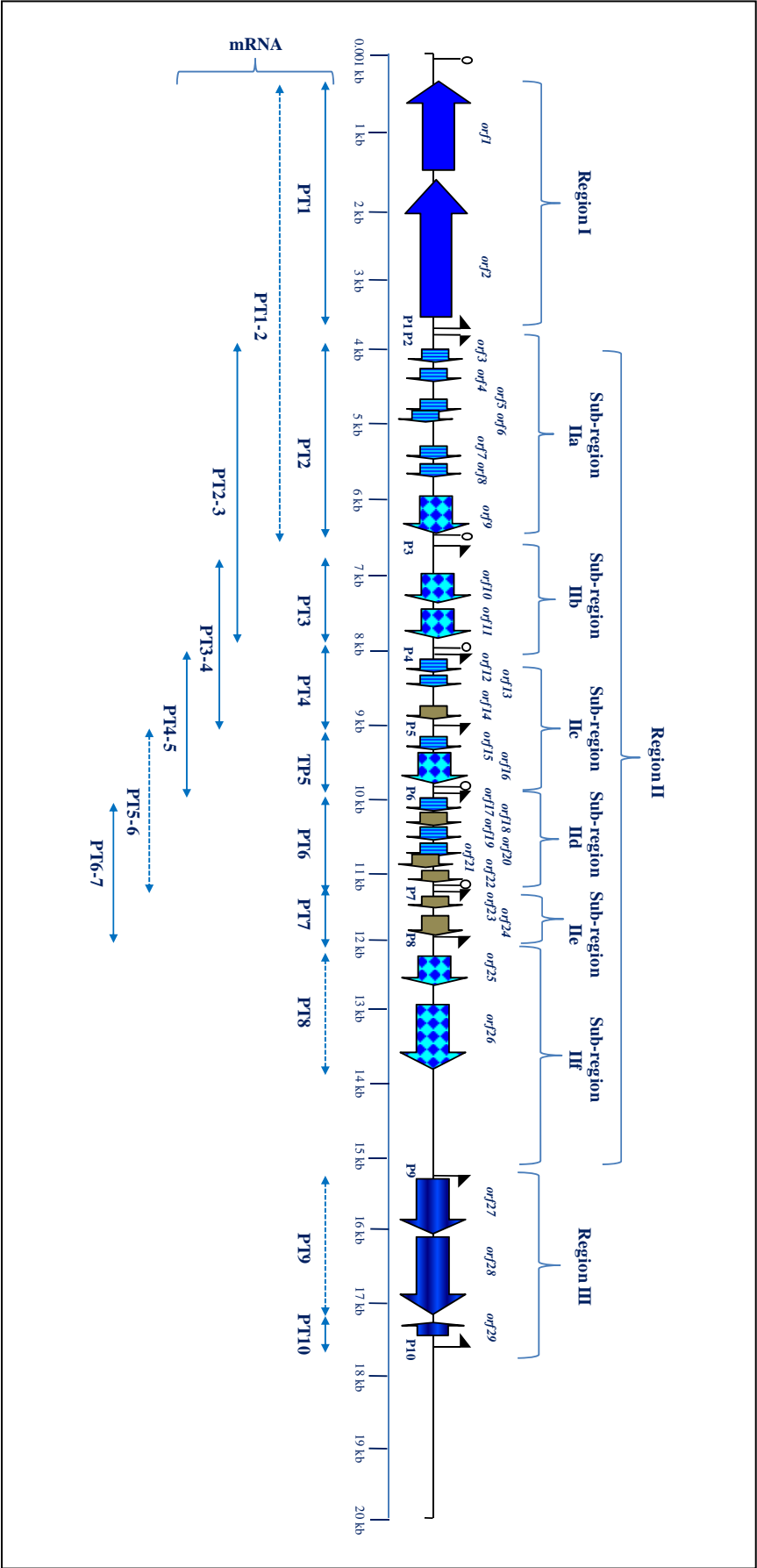


Figure 4.2. Physical map showing the genetic organization of a 17,730-bp multibacteriocinogenic cluster present in *S. infantarius* LP90. Putative ORFs are represented by wide arrows indicating the direction of transcription. Small flags and loop symbols indicate putative promoters and *rho*-independent transcription termination regions, respectively. Horizontal arrows below the genes refer to the transcriptional and co-transcriptional units as determined by RT-PCR. Dashed arrows refer to genes not transcribed or not co-transcribed.

Sub-region IIe (coordinates 11,212-11,953) comprises 2 ORFs (*orf23* to *orf24*). *orf23* and *orf24* share a promoter region (P7) preceded by two direct repeat elements (DR7l and DR7r) spaced by 9 bp. These ORFs encode putative 76 and 103-amino-acid peptides, respectively, identical to streptococcal proteins of unknown function. The last sub-region, IIc (coordinates 12,056-15,180), consists of 2 ORF (*orf25* and *orf26*). *orf25* is preceded by a promoter region (P8) and two direct repeat elements (DR8l and DR8r) spaced by 9 bp. This ORF encodes a putative 117-amino-acid protein with homology to a streptococcal bacteriocin immunity protein. Likewise, *orf26* encodes a putative 348-amino-acid protein with homology to a streptococcal bacteriocin immunity/modification protein. In summary, according to their physico-chemical characteristics (Table IV.2) and homology to known bacteriocins, the region II (sub-regions IIa, IIc, and IId) includes 12 genes likely encoding bacteriocins.

Table IV.2. Hypothetical bacteriocins and induction factor encoded by *Streptococcus infantarius* LP90

Gene		Protein				
ORF	Name	Name	Length (aa)	Size (Da)	pI	Amino acid sequence
<i>orf3</i>	<i>infC</i> ₂	InfC ₂	62	5,680	8.05	YSAIDCRNAMLGTIASGIIAGGTGAGLATLVGVGGLAGAFVGAHIGAIGGGLTCVGMIGNKFL
<i>orf4</i>	<i>infC</i> ₁	InfC ₁	42	3,702	8.05	KGNLGSAGGCGIGGVILAAATGPLTGGAAALVCVGSGLSAYL
<i>orf5</i>	<i>infB</i> ₂	InfB ₂	52	4,681	8.03	YSAGACLTDIGLGMVGGGAAGVAGGVAGIALGVALGQIGGNVRCITSYVGGK
<i>orf6</i>	<i>infB</i> ₁	InfB ₁	43	4,009	4.37	VNWGVAAGYCVAGALIGAAGGAISAGVGCLVSGLQEVSDGLFK
<i>orf7</i>	<i>infA</i> ₂	InfA ₂	29	3,000	10.40	DNITKGAYKLGKATRQAAGAIGKAVGKLF
<i>orf8</i>	<i>infA</i> ₁	InfA ₁	30	3,357	8.76	DDLKLVNQGFGAICSFIDGFGKKYRGKC
<i>orf12</i>	<i>infD</i> ₁	InfD ₁	54	4,988	8.05	NKCVNAIFGGALTGAGSGFVGGMATLGVTSIPGAFVGAHFGAAGGLYCVGASL
<i>orf13</i>	<i>infD</i> ₂	InfD ₂	43	3,902	8.03	GKVGAAVGGCLGGMLLAWAGGPVTATGYAVVCGTAGAAAAAYFN
<i>orf15</i>	<i>infE</i>	InfE	49	5,162	8.79	KTIYYGNGLYCNANKCWVNWWSQTATTIANNVINGLTGGNAGWHSGGIA
<i>orf17</i>	<i>infF</i>	InfF	54	5,290	9.70	GCNWKGAATVAVGAVGGAIGKAVTTYSWQGAALKAVGYGIKAGVAYGVTCRWT
<i>orf19</i>	<i>infG</i> ₁	InfG ₁	43	4,033	10.10	KSEGRNMGCILGTAGMAGAGFLVAGPAGAAALGGATALRVCR
<i>orf20</i>	<i>infG</i> ₂	InfG ₂	42	3,764	8.90	KVSPTCAALVAASIYGGGLAVAGPAGVGLAMAVGGAAAGSFCR
<i>orf29</i>	<i>orf29</i>	Induction factor	21	2,597	6.90	DTHLLAGLWDWFKRHPDYKQA

Finally, region III (coordinates 15,197-17,625) comprises 3 ORFs (*orf27-orf29*). *orf27* and *orf28* share a promoter region (P9) preceded by two direct repeat elements (DR9l and DR9r) spaced by 9 bp and encode putative 241 and 439-amino-acid proteins which show homology to a streptococcal response regulator (RR) and a streptococcal sensor histidine kinase (HPK), respectively. On the other hand, *orf29*, which is located in the complementary strand, is preceded by a promoter region (P10) and two direct repeat elements (DR10r and DR10l) spaced by 9 bp. This ORF encodes a 49-amino acid peptide containing a 28-amino acid leader sequence of the GG-type and showing homology to a streptococcal protein of the ComC family.

IV.4.2. Transcriptional analysis of the multibacteriocinogenic gene cluster from *S. infantarius* LP90

Transcription of the genes included in the multibacteriocinogenic gene cluster of *S. infantarius* LP90 was analysed by RT-PCR. mRNA transcripts of the expected size were detected at the following regions (Figs. 4.2 and 4.3, panels A and B): (i) region I (putative transcript T1, PT1) (*orf1* and *orf2*); (ii) region II, sub-region IIa (PT2, *orf3-orf9*), sub-region IIb

(PT3, *orf10-orf11*), sub-region IIc ([PT4, *orf12-orf14*] and [PT5, *orf15-orf16*]), sub-region IId (PT6, *orf17-orf22*), and sub-region IId (PT7, *orf23* and *orf24*), and (iii) region III (PT10, *orf29*). No RT-amplicons were detected at sub-region IIc (PT8) (*orf25* and *orf26*) and region III (PT9) (*orf27* and *orf28*). Similarly, no amplicons were detected in the PCRs carried out using the isolated RNA as template (negative controls), indicating that contaminating DNA was not present in these samples. Next, the presence of co-transcriptional units was investigated. The results obtained revealed that the following regions are co-transcribed (Fig. 4.2 and Fig. 4.3, panel C): (i) sub-regions IIa and IIb (PT2-3, *orf3-orf11*); (ii) sub-regions IIb and IIc (PT3-4, *orf10-orf14*); (iii) sub-region IIc (PT4-5, *orf12-orf16*), and (iv) sub-regions IId and IId (PT6-7, *orf17-orf24*). No co-transcriptional unit was found between sub-regions IIc and IId (PT5-6, *orf15-orf22*).

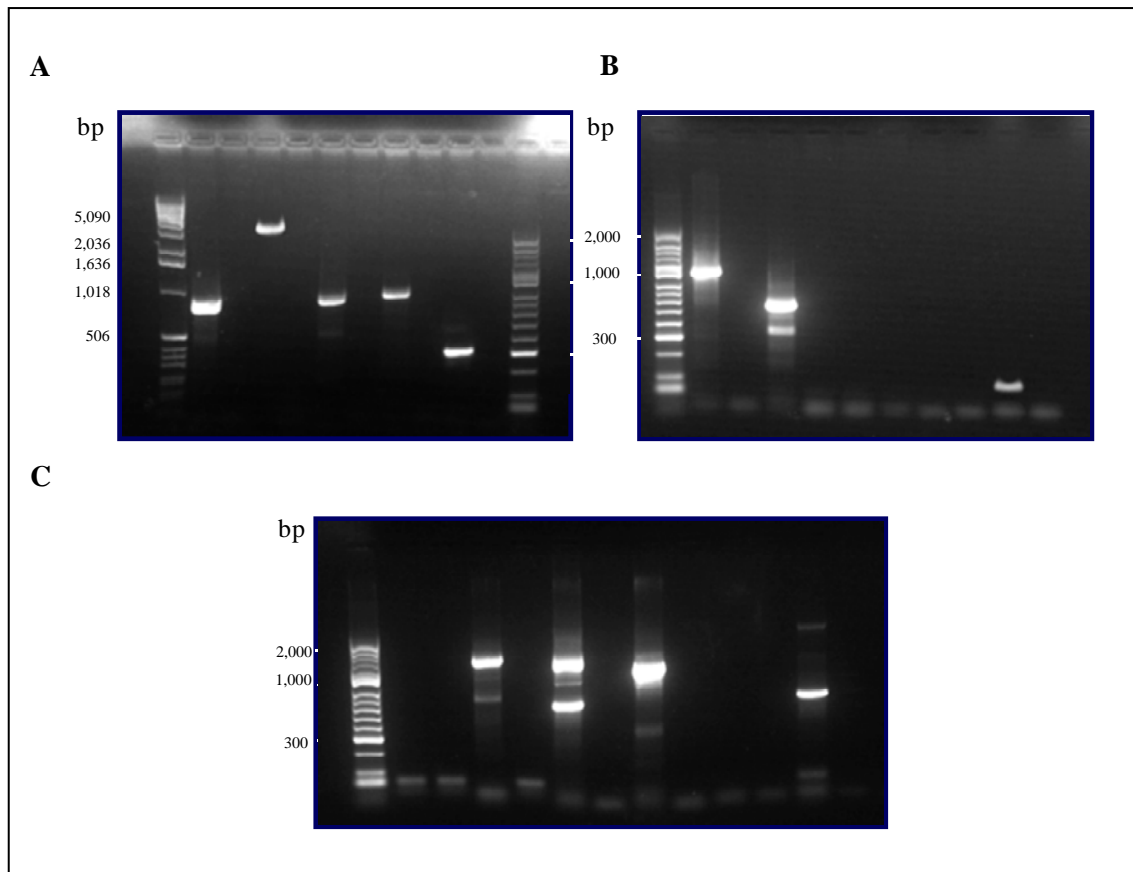


Figure.4.3. Transcriptional (A) and (B), and cotranscriptional (C) analyses of the multibacteriocinogenic cluster from *S. infantarius* LP90 by RT-PCR. C+: RT-PCR products obtained using mRNA as template. N: PCR negative controls performed using total RNA as template. M1 and M2: 1Kb DNA Ladder and Hyperladder II, respectively. Bp: base pair.

IV.4.3. Purification and mass spectrometry of the bacteriocins secreted by *S. infantarius* LP90

In order to identify the bacteriocins secreted by *S. infantarius* LP90 grown in MRS at 37 °C for 12 h, different procedures were used according to the charge and hydrophobicity of the products of the putative bacteriocin structural genes found in its genome.

IV.4.3.1. Bacteriocin purification procedure based on cation-exchange and reversed-phase chromatographies in an ÄKTA-FPLC system (procedure P1)

The antimicrobial peptides secreted by *S. infantarius* LP90 were purified to homogeneity by subjecting the fraction obtained from gel filtration to cation-exchange and reversed-phase chromatographies in an ÄKTA-FPLC system. The reversed-phase-FPLC step resulted in two well-separated absorbance peaks (fractions 26 and 28), eluting at 30 and 32% (v/v) 2-propanol in aqueous TFA (0.1%, v/v), respectively (Fig. 4.4), and showing antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797. Moreover, fraction 28 also exerted antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405. The results of this purification procedure are summarized in Table IV.3. It is worth noting that fraction 26 showed a recovery of 0.01% of the original antimicrobial activity and an increase in the specific antimicrobial activity of 18-fold against *P. damnosus* CECT4797. On the other hand, fraction 28 showed a recovery of 20 and 1.10% of the original antimicrobial activity and an increase in the specific antimicrobial activity of 18,500 and 1,028-fold against *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797, respectively.

The molecular mass of the purified fractions was analyzed by MALDI-TOF MS. As shown in Fig.4.5, fraction 26 contained major peaks of 4,714; 3,354 and 2,359 Da, while fraction 28 resulted in a clearly predominant peak of 3,963 Da.

Table IV.3. Purification of the bacteriocins produced by *S. infantarius* LP90 using the procedure P1

Supernatant and purification stage	Volume (ml)	Total A ₂₅₄ ^a	Total activity (BU) ^b	Sp act (BU/A ₂₅₄) ^c	Increase in sp act (fold) ^d	Total activity (%)
<i>S. pneumoniae</i> 66405						
Culture supernatant	1,000.00	27,300.00	354,000.00	13.00	1.00	100.00
Ammonium sulphate precipitation	200.00	1,800.00	120,000.00	67.00	5.00	34.00
Gel filtration chromatography	280.00	840,000.00	140,000.00	167.00	13.00	39.00
Cation-exchange chromatography	12.00	1.20	200,000.00	167,000.00	12,800.00	56.00
Reversed-phase chromatography						
Fraction 26	2.00	0.20	NID	NID	NE	NE
Fraction 28	2.00	0.30	71,600.00	240,000.00	18,500.00	20.00
<i>P. damnosus</i> CECT4797						
Culture supernatant	1,000.00	27,300.00	1,772,000.00	65.00	1.00	100.00
Ammonium sulfate precipitation	200.00	1,800.00	482,000.00	268.00	4.00	27.00
Gel filtration chromatography	280.00	840,000.00	450,600.00	536.00	8.00	25.00
Cation-exchange chromatography	12.00	1.20	198,200.00	165,200.00	2,500.00	11.00
Reversed-phase chromatography						
Fraction 26	2.00	0.20	240.00	1,200.00	18.00	0.01
Fraction 28	2.00	0.30	20,050.00	66,800.00	1,028.00	1.10

Antimicrobial activity of the fractions obtained using a purification procedure based on cation-exchange and reversed-phase chromatographies in an ÄKTAFLPC system. ^aAbsorbance at 254 nm (A₂₅₄) multiplied by the volume in milliliters. ^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml), as determined by an MPA, multiplied by the total volume in milliliters. ^cSpecific antimicrobial activity expressed as the total antimicrobial activity (BU) divided by the total A₂₅₄. ^dThe specific antimicrobial activity of a fraction (BU/A₂₅₄) divided by the specific antimicrobial activity of the culture supernatant (BU/A₂₅₄). NID, no inhibition detected; NE, not evaluable.

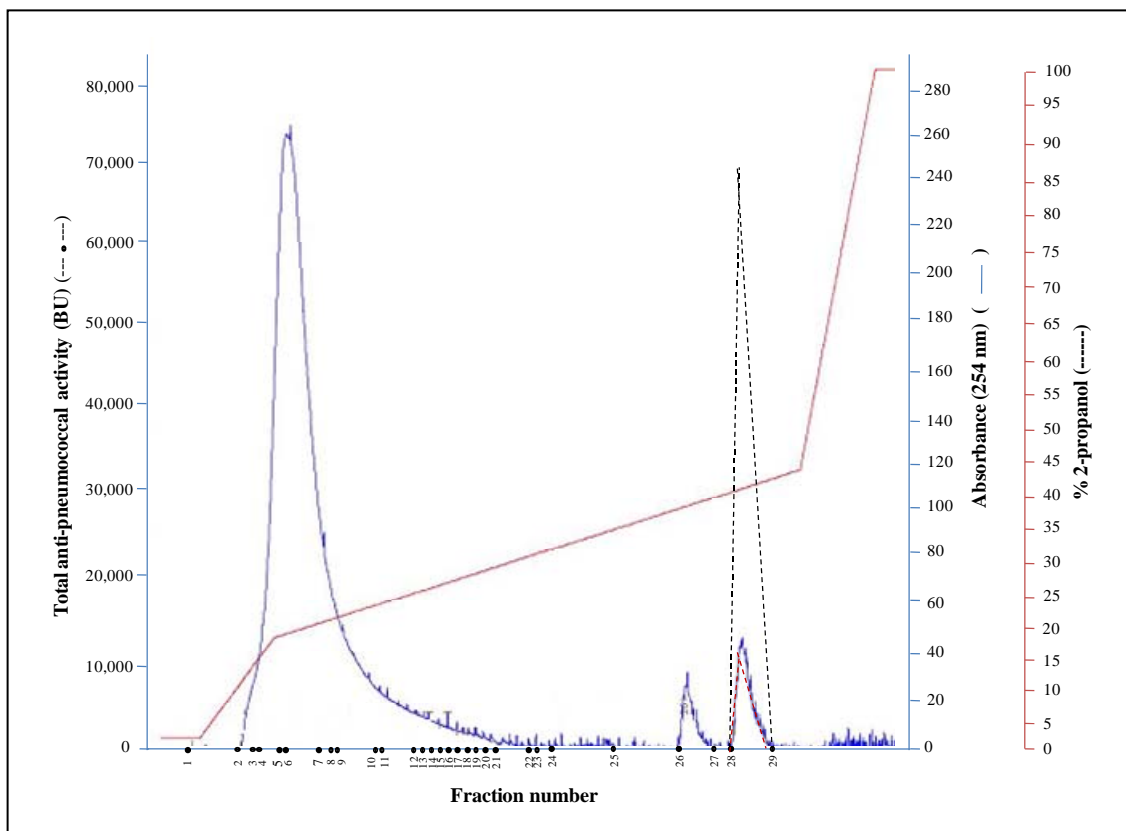


Figure 4.4. RP-FPLC chromatography showing the peptides obtained from a *S. infantarius* LP90 CFS subjected to purification procedure P1. Fractions 26 and 28 eluted at 30 and 32% (v/v) 2-propanol in aqueous TFA (0.1%, v/v), respectively. Red and black dashed lines indicate antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797, respectively.

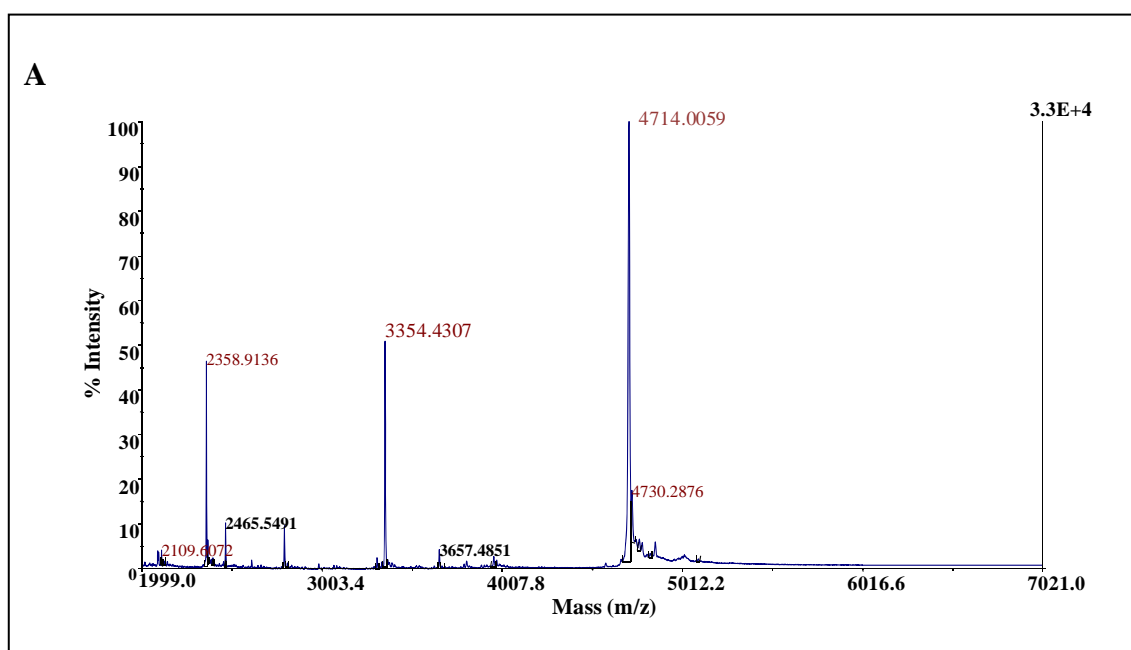


Figure 4.5. Mass spectrometry analysis of the antimicrobial peptides obtained from a *S. infantarius* CFS using purification procedure P1. A: fraction 26. B: fraction 28.

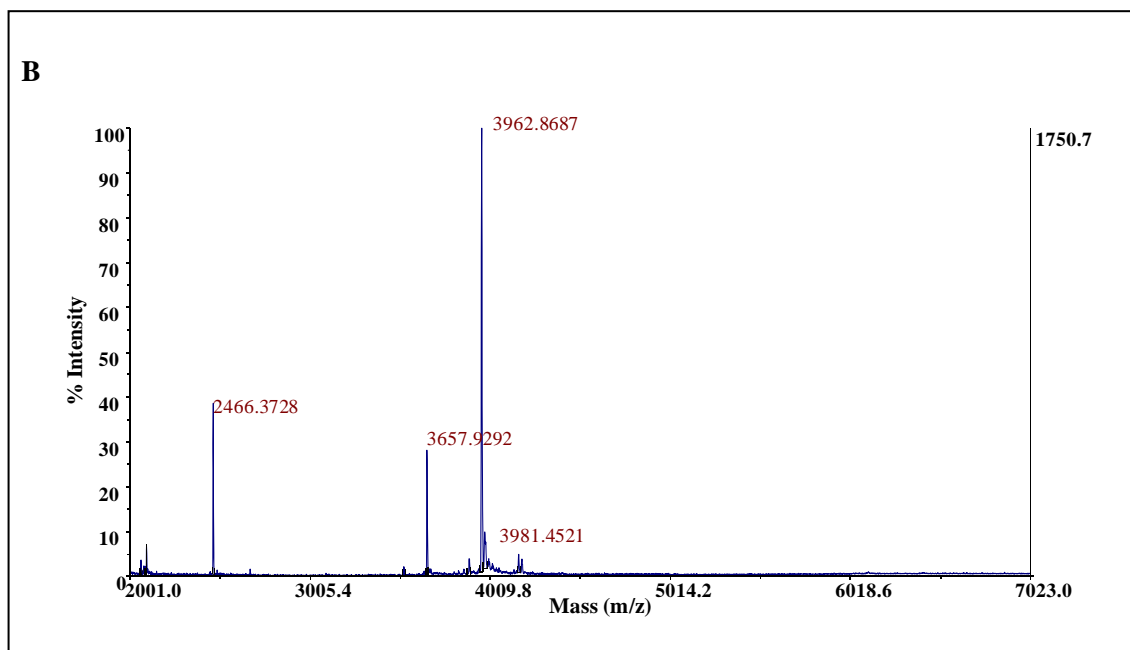


Figure 4.5. Continued.

IV.4.3.2. Bacteriocin purification procedure based on anion-exchange and hydrophobic-interaction batch chromatographies followed by reverse-phase chromatography in an ÄKTA-FPLC system (procedure P2)

In order to purify additional bacteriocins putatively produced by *S. infantarius* LP90 and, according to the lack of positive charge of InfB₁ (pI 4.37) in NaP buffer (pH 6.0), the fraction obtained from gel filtration was subjected to anion-exchange and hydrophobic-interaction batch chromatographies, followed by reversed-phase chromatography in an ÄKTA-FPLC system. The reversed-phase-FPLC step resulted in three peaks (fractions 15, 17, and 18) eluting at 34, 36 and 38% (v/v) 2-propanol in aqueous TFA (0.1%, v/v), respectively (Fig. 4.6), and showing antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797. Moreover, fraction 17 also exerted antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405. The results of this purification procedure are summarized in Table IV.4. Fractions 15 and 18 showed a recovery of 0.05 and 0.7% of the original antimicrobial activity, respectively, and an increase in the specific antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 of 7 and 600-fold, respectively. On the other hand, fraction 17 showed a recovery of 1.6 and 2.6% of the original antimicrobial activity, and an increase in the specific antimicrobial activity of 1,720 and 2,925-fold against *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797, respectively.

The molecular mass of the fractions detected by MALDI-TOF MS revealed predominant peaks with molecular masses of 4,718, 3,968, and 4,067 Da for fractions 15, 17 and 18, respectively (Fig. 4.7). Moreover, two lower intensity peaks with molecular masses of 4,051 and 4,004 Da were also found in fractions 17 and 18, and 18, respectively.

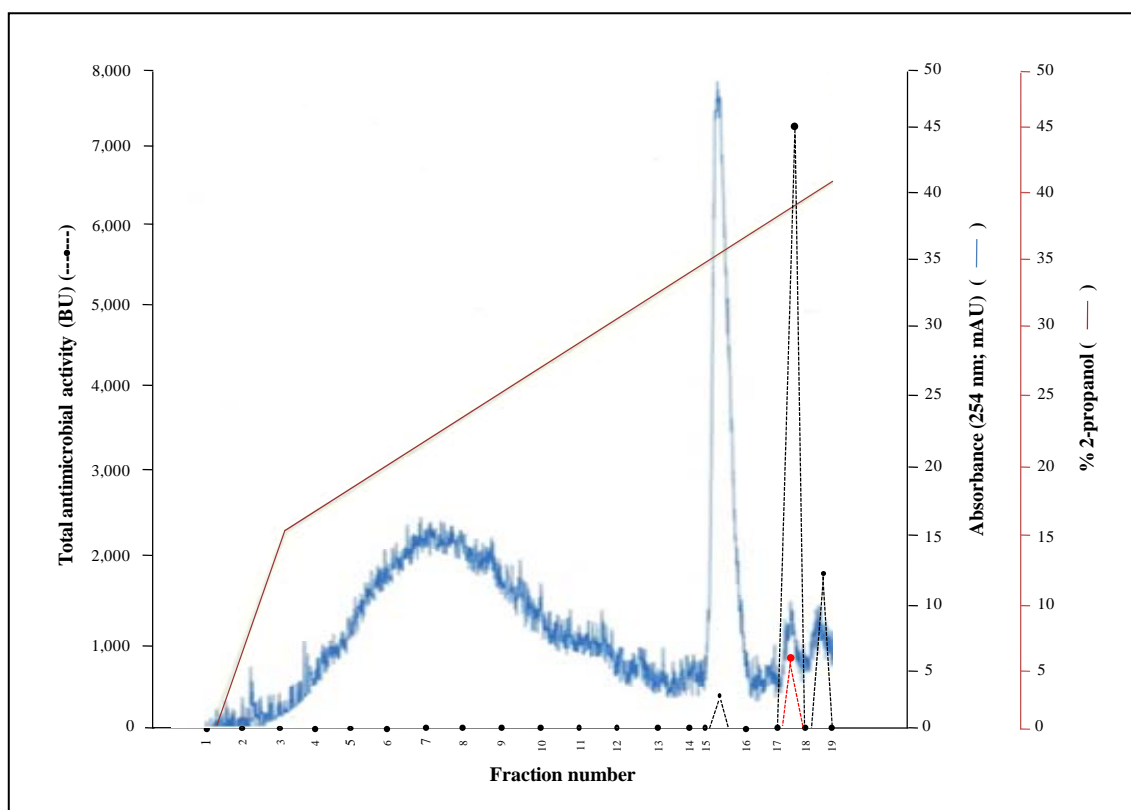


Figure 4.6. RP-FPLC chromatography showing the peptides obtained from a *S. infantarius* LP90 CFS subjected to purification procedure P2. Fractions 15, 17, and 18 eluted at 34, 36, and 38% (v/v) 2-propanol in aqueous TFA (0.1%, v/v), respectively. Red and black dashed lines indicate antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797, respectively.

Table IV.4. Purification of the bacteriocins produced by *S. infantarius* LP90 using the procedure P2

Supernatant and purification stage	Volumen (ml)	Total A_{254} ^a	Total activity (BU) ^b	Sp act (BU/ A_{254}) ^c	Increase in sp act (fold) ^d	Total activity (%)
<i>S. pneumoniae</i> 66405						
Culture supernatant	1,000.00	4,400.00	69,400.00	16.00	1.00	100.00
Ammonium sulphate precipitation	200.00	883.00	46,800.00	53.00	3.00	67.00
Gel filtration chromatography	280.00	291.00	25,400.00	87.00	5.00	37.00
Anion-exchange chromatography	50.00	0.40	3,400.00	8,500.00	531.00	5.00
Hydrophobic-interaction chromatography	10.00	0.20	1,200.00	6,000.00	375.00	2.00
Reversed-phase chromatography						
Fraction 15	2.70	0.30	NID	NID	NE	NE
Fraction 17	2.50	0.04	1,100.00	27,500.00	1,720.00	1.60
Fraction 18	2.70	0.05	NID	NID	NE	NE
<i>P. damnosus</i> CECT4797						
Culture supernatant	1,000.00	4,400.00	290,000.00	65.00	1.00	100.00
Ammonium sulfate precipitation	200.00	883.00	235,000.00	265.00	4.00	81.00
Gel filtration chromatography	280.00	291.00	156,000.00	535.00	8.00	54.00
Anion-exchange chromatography	50.00	0.40	14,500.00	36,250.00	555.00	5.00
Hydrophobic-interaction chromatography	10.00	0.20	3,000.00	15,000.00	230.00	1.00
Reversed-phase chromatography						
Fraction 15	2.70	0.30	150.00	500.00	7.00	0.05
Fraction 17	2.50	0.04	7,600.00	190,000.00	2,925.00	2.60
Fraction 18	2.70	0.05	1,950.00	39,000.00	600.00	0.70

Antimicrobial activity of the fractions obtained by bacteriocin purification procedure based on anion-exchange and hydrophobic-interaction chromatographies, followed by reversed-phase chromatography in an ÄKTAFLPC system.^aAbsorbance at 254 nm (A_{254}) multiplied by the volume in milliliters. ^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml), as determined by an MPA, multiplied by the total volume in milliliters. ^cSpecific antimicrobial activity expressed as the total antimicrobial activity (BU) divided by the total A_{254} . ^dThe specific antimicrobial activity of a fraction (BU/ A_{254}) divided by the specific antimicrobial activity of the culture supernatant (BU/ A_{254}). NID, no inhibition detected; NE, not evaluable.

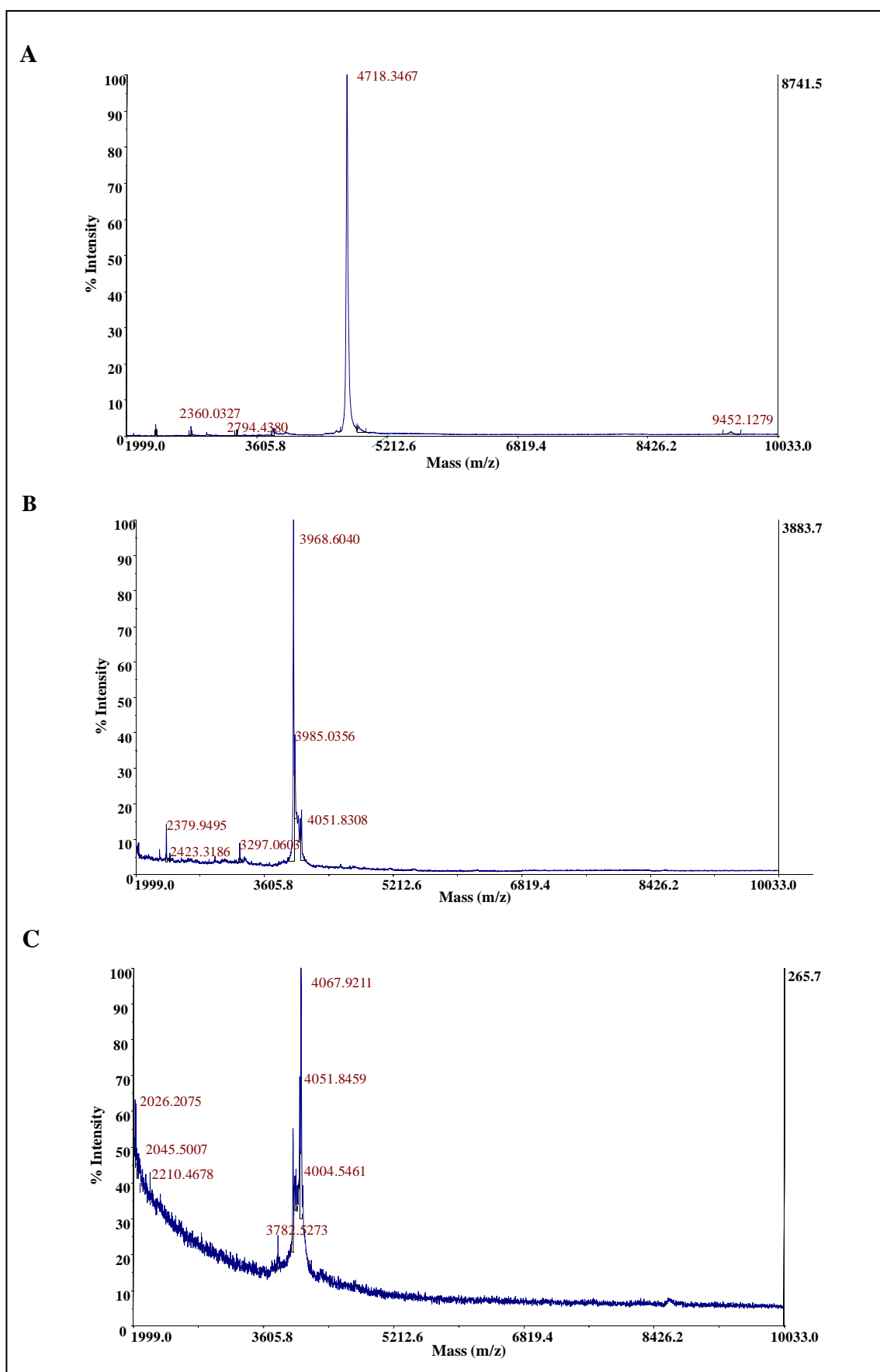


Figure 4.7. Mass spectrometry analysis of the antimicrobial peptides obtained from a *S. infantarius* CFS using purification procedure #2. A: fraction 15. B: fraction 17. C: fraction 18.

IV.4.3.3. Partial bacteriocin purification procedure based on cation-exchange and hydrophobic-interaction batch chromatographies (procedure P3).

Based on known limitations of purification procedures which may hinder the identification of some of the produced bacteriocins, a crude fraction, obtained after gel filtration and cation-exchange and hydrophobic-interaction batch chromatographies of the proteins present in a *S. infantarius* LP90 CFS, was analyzed by MALDI-TOF MS. The results obtained revealed several peaks with molecular masses included in the size range of peptide bacteriocins (3-6 kDa) (Fig. 4.8).

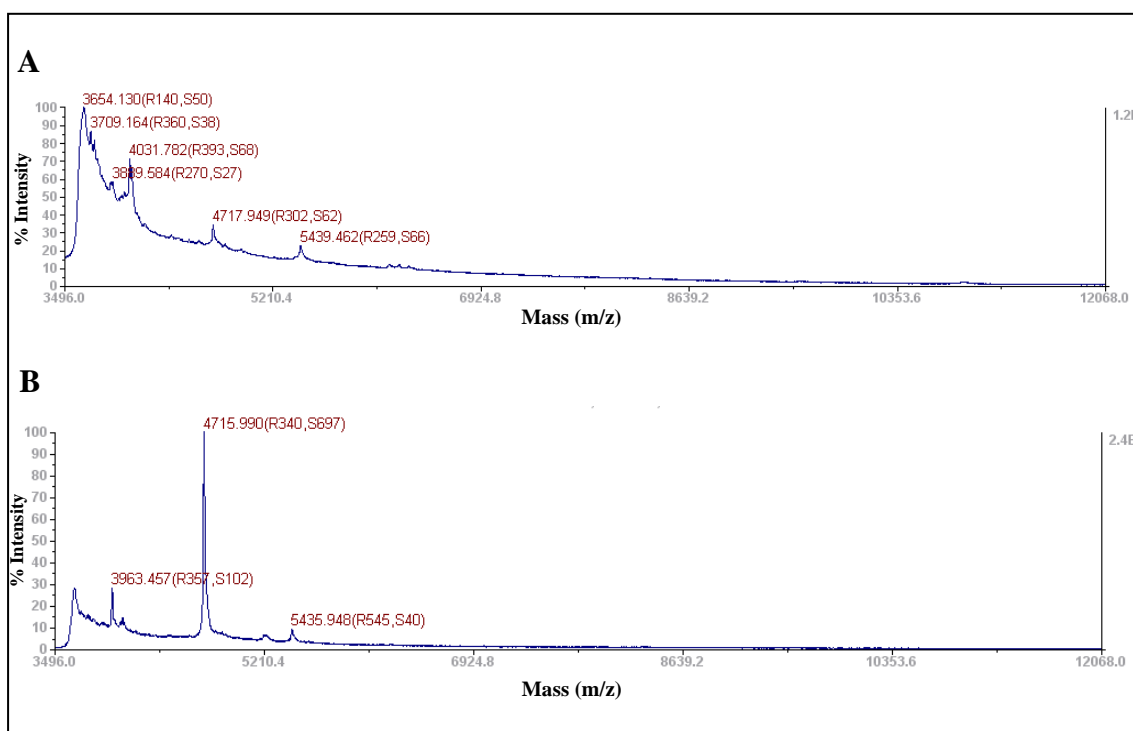


Figure 4.8. Mass spectrometry analysis of the proteins obtained from a *S. infantarius* LP90 CFS using purification procedure P3. A: crude protein sample; B: precipitated (2-D Clean-Up Kit, Sigma-Aldrich) protein sample.

IV.4.4. Colony mass spectrometry

Secretion of the bacteriocins and the putative IF produced by *S. infantarius* LP90 was investigated by CMS. The results obtained from this analysis revealed the presence of three major peaks of 1,490; 2,246; and 3,966 Da (results not shown) in the CFS obtained from the colonies grown on MRS solid media at 37 °C.

IV.5. DISCUSSION

In this work, we describe the nucleotide sequence and the transcriptional analysis of a multibacteriocinogenic gene cluster from the anti-pneumococcal strain of dairy origin *S. infantarius* LP90. Firstly, according to the high homology between the amino acid sequence of InfA₁ (originally termed InfA [Chapter III]) purified from the CFS of *S. infantarius* LP90 cultures and a hypothetical protein of unknown function of *S. infantarius* subsp. *infantarius* ATCCBAA-102 (Genbank accession no. ZP_02920122¹), specific primers were designed based on the nucleotide sequence of its gene (coordinates 22,231-22,386 of the *S. infantarius* ATCCBAA-102 genome [Genbank accession no. ABJK02000019]). From this point, a nucleotide sequence of 17,730 bp containing 29 putative ORFs and showing a 99% homology to the nucleotide sequence of *S. infantarius* ATCCBAA-102 was obtained. Computer analysis of this sequence revealed that the gene encoding InfA₁ (*infA*₁) is included in a multibacteriocinogenic gene cluster which can be divided into three functional regions: (i) region I (*orf1-orf2*), involved in bacteriocin/IF secretion; (ii) region II (*orf3* to *orf26*), involved in bacteriocin synthesis and immunity, and (iii) region III (*orf27* to *orf29*), involved in transcriptional regulation. This genetic organization suggests that *S. infantarius* LP90 is a potential multibacteriocinogenic strain whose bacteriocins would share the same secretion and regulation system. Results of the BLAST analysis of the obtained sequence revealed that region II contains 10 genes (*orf3-orf6*, *orf12-orf13*, *orf15*, *orf17*, and *orf19-orf20*) encoding peptides showing homology to streptococcal bacteriocins or enhancer peptides (Table IV.1). These peptides have a relatively low size (<6 kDa) and a high pI (Table IV.2), which are characteristic of class I and II bacteriocins (Nes *et al.*, 1996). Moreover, they contain N-terminal extensions of the GG-type of 15-30 amino acid residues (Fig. 4.1), which are typical of the bacteriocins secreted by dedicated ABC transporters which carry out their proteolytic removal together with bacteriocin externalization (Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003). Similarly, despite their lack of homology to known bacteriocins, the products of the genes *orf7-orf8* share these characteristics as well (Table IV.1 and Fig. 4.1), strongly suggesting that they also encode class II bacteriocins. Ten out of these twelve putative bacteriocin structural genes might act cooperatively (class IIb bacteriocins), as suggested by their tandem organization and high homology to other two-peptide bacteriocin systems. Namely, these systems would be: (i) InfC₁ (*orf4*) and InfC₂ (*orf3*), (ii) InfB₁ (*orf6*) and InfB₂ (*orf5*), (iii) InfA₁ (*orf8*) and InfA₂ (*orf7*), (iv) InfD₁ (*orf12*) and InfD₂ (*orf13*), and (v), InfG₁ (*orf19*) and InfG₂ (*orf20*), which constitute the

¹The nucleotide sequence of the InfA bacteriocin gene cluster of *S. infantarius* LP90 (6,943 bp) was deposited in March 2010 at the GenBank sequence database (accession number ADF87548). The accession number of the *S. infantarius* ATCCBAA-102 hypothetical protein of unknown function (ZP_02920122, deposited in March 2008) was replaced in August 2012 by EDT47634, and, based on the information given for InfA in ADF87548, the protein was redefined as a “bacteriocin-type signal sequence” Note: the complete nucleotide sequence of the InfA bacteriocin gene cluster of *S. infantarius* LP90 (19,539 bp) was deposited in February 2014 at the GenBank sequence database under accession number KJ475434.

two-peptide bacteriocins InfC, InfB, InfA, InfD and InfG, respectively. On the other hand, according to their amino acid sequence, InfE (*orf15*) and InfF (*orf17*) belong to the subclass IIa (although with a slightly modified N-terminal consensus sequence, *i.e.*, YGNGLYC instead of YGNGVXC) and IIe, respectively. Several loci displaying characteristics of class II bacteriocin gene clusters have been identified in the genome of different *Streptococcus* spp., such as: (i) *blp_{Sp}* in *S. pneumoniae* (De Saizieu *et al.*, 2000), (ii) *blp_{St}* in *S. thermophilus* (Fontaine *et al.*, 2007), (iii) *bsm* and mutacins IV and V loci in *S. mutans* (Hale *et al.*, 2005; Van der Ploeg, 2005), and (iv) *sil* in *S. pyogenes* (Hidalgo-Grass *et al.*, 2002). Moreover, the presence of a high number of bacteriocin genes, although lower than that found in this study, seems to be common in streptococci. In this respect, in the *S. pneumoniae* TIGR4 genome, seven putative peptide bacteriocin genes have been annotated (Nes *et al.*, 2007). However, their bacteriocin activity has not been proved yet. Similarly, analysis of the *S. mutans* genome revealed 8 ORFs that could encode class II bacteriocins within a region of about 20 kb (Van der Ploeg, 2005), while the analysis of the *blp_{St}* locus of *S. thermophilus* LMD-9 revealed various bacteriocin-like peptides containing a leader sequence of the GG-type (Fontaine *et al.*, 2007).

On the other hand, according to computer analysis of the *S. infantarius* LP90 nucleotide sequence obtained in this work, region II also contains 5 genes (*orf10*, *orf11*, *orf16*, *orf25* and *orf26*) displaying homology to bacteriocin immunity proteins, and 1 gene (*orf9*) showing homology to CAAX amino-terminal proteases, also known as Abi proteins, which have been shown to be involved in self-immunity against bacteriocins (Kjos *et al.*, 2010). The proteins encoded by *orf9*, *orf10*, *orf25* and *orf26* contain six, three, three and two transmembrane segments (as determined by the SOSUI program, http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html), respectively, which is in agreement with the hypothesis that bacteriocin immunity proteins are usually membrane proteins (Diep *et al.*, 1996); on the other hand, *orf11* and *orf16* seem to encode soluble proteins. In this respect, the lactococcin A immunity protein, which is not a typical membrane protein either, contains a putative alpha-amphiphilic helix which may traverse the membrane and, in the presence of the bacteriocin, interact with the receptor-bacteriocin complex preventing membrane permeabilization (Nissen-Meyer *et al.*, 1993; Venema *et al.*, 1994; Diep *et al.*, 2007). Concerning their location, the genes of most non-lantibiotic immunity proteins are generally found immediately downstream and in the same operon as the bacteriocin structural gene (Nes *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003). In this respect, the proteins encoded by *orf9* and *orf16* could act as immunity proteins to protect *S. infantarius* LP90 against InfC-InfB-InfA and InfE, respectively. On the other hand, there are also some examples of putative immunity protein genes located in an operon different to that containing the bacteriocin structural genes, such as *blpY*, *blpX* and *blpL* in *S. pneumoniae* (De Saizieu *et al.*, 2000). In this respect, *orf10*, *orf11*, *orf25* and *orf26* would present an atypical location as well. Moreover, it is not clear against which bacteriocin/s would *orf10* and *orf11* confer immunity, while the immunity protein/s for InfF and InfG₁-G₂ is/are not located in the

same operon as their bacteriocin structural genes. On the other hand, *orf25* and *orf26* seem not be transcribed (see below).

To elucidate which genes of the *S. infantarius* LP90 multibacteriocinogenic locus are transcribed under the experimental conditions used in this work, RT-PCR was carried out. The results obtained from these analyses showed that bacteriocins/IF transporter genes (region I), as well as all the putative bacteriocin structural and immunity genes (region II), except *orf25* and *orf26*, were transcribed. With regard to the genes potentially involved in bacteriocin regulation (region III), only *orf29*, encoding a putative IF, was transcribed. It is known that streptococcal bacteriocinogenic clusters are commonly regulated at the transcriptional level by a three-component quorum sensing mechanism (De Saizieu *et al.*, 2000; Van der Ploeg, 2005; Fontaine *et al.*, 2007). In these systems, the mature form of the IF triggers the expression of all the genes necessary for bacteriocin production through their interaction with HPK, which in turn activates the RR, which is finally responsible of interacting with the corresponding regulatory regions at the DNA level (Fontaine *et al.*, 2007).

In an attempt to identify other bacteriocins, in addition to InfA₁ (Chapter III), secreted by *S. infantarius* LP90, different purification procedures were tested. Taking into account that some bacteriocins act only on a narrow range of target bacteria, *P. damnosus* CECT4797, a strain very sensitive to bacteriocin activity (unpublished results), was used along with *S. pneumoniae* 66405 as indicator microorganism to aid in the identification of bacteriocins not exerting anti-pneumococcal activity. The purification procedure based on cation-exchange and reversed-phase-chromatographies in an ÄKTA-FPLC system (procedure P1) yielded two fractions (26 and 28) (Fig. 4.4). In fraction 26, a peptide that, according to the molecular mass obtained in the MALDI-TOF MS analysis (4,714 Da) (Fig. 4.5, panel A) could correspond to InfB₂ (4,681 Da), was detected. In this context, although the molecular mass of the purified peptide is approximately 32 Da higher than that predicted from its amino acid sequence, this difference might be due to a spontaneous modification of the methionine residue of InfB₂ (Met14) to methionine disulfide (MetSO₂) (addition of 32Da). Moreover, this analysis also revealed the presence in the same fraction of a peak showing a molecular mass (3,354 Da) very similar to the predicted molecular mass of InfA₁ (3,357 Da). Surprisingly, this fraction did not display anti-pneumococcal activity, in contrast with the peptide of 3,963 Da found in fraction 28 (Fig. 4.5, panel B) and previously shown to correspond to modified InfA₁ (Chapter III). The low antimicrobial activity recovery of the fraction eluted from the cation-exchange FPLC-chromatography against *P. damnosus* CECT4797 (11%) (Table IV.3) suggests that other antimicrobial peptides that could have been present in the *S. infantarius* LP90 CFS did not bind to the cationic resin. In this context, the lack of positive charge of InfB₁ (pI 4.37) in the NaP buffer (pH 6.0) would hinder its binding to this resin. Therefore, cation-exchange chromatography was replaced by anion-exchange and hydrophobic-interaction batch chromatographies followed by reversed-phase chromatography in an ÄKTA-FPLC system (procedure P2) in an attempt to enhance the recovery of this bacteriocin. This procedure yielded

three main fractions (Fig. 4.6) of 4,718, 3,968 and 4,067 Da (Fig. 4.7), which might correspond to InfB₂, modified InfA₁ and InfG₁ (predicted molecular mass of 4,033 Da) respectively, as well as two small peaks with molecular masses of 4,004 and 4,051 Da, which could correspond to the InfB₁ (predicted molecular mass of 4,009 Da) and another modified InfG₁, respectively. As in the case of InfB₂, the molecular mass of modified InfG₁ was approximately 32 Da higher than the predicted one. In this context, considering that InfG₁ contains two methionine residues at positions 8 and 17, the observed molecular mass (4,067 Da) could be the result of the conversion of one Met to MetSO₂ (addition of 32 Da) or the conversion of the two Met to methionine sulfoxide (MetSO) (addition of 16 Da each one). Likewise, the lower intensity peak with a molecular mass of 4,051 Da could also correspond to InfG₁ due to the conversion of only one Met to MetSO (addition of 16 Da). Additionally, a cruder fraction obtained after cation-exchange and hydrophobic-interaction batch chromatographies (procedure P3), was subjected to MALDI-TOF MS. The results obtained (Fig. 4.8) revealed the presence of modified InfA₁ (3,963 Da), as well as of modified InfB₂ (4,718 Da). Furthermore, a peak of a molecular mass (4,031 Da) very similar to that predicted for InfG₁ (4,033 Da) was also identified. Likewise, a peak of 3,709 Da, which could correspond to InfC₁ (3,702 Da) was identified as well. Although other peaks showing molecular masses in the range of the 3-6 kDa were found, none of them seem to correspond to the (unmodified) putative bacteriocins encoded in this multibacteriocinogenic gene cluster. In a final attempt to identify other bacteriocins secreted by *S. infantarius* LP90 that could have been lost during purification, CMS was performed. This method allowed the detection of three major peaks of 1,490, 2,246 and 3,966 Da, of which only the molecular mass of the latter nearly matches that of modified InfA₁ (3,963 Da).

Therefore, we succeeded in the identification of the production of five (InfA₁, InfB₁, InfB₂, InfC₁ and InfG₁) of the twelve putative bacteriocins encoded by *S. infantarius* LP90, which are characterized by displaying antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797, except modified InfA₁ (3,963Da), which also shows antimicrobial activity against *S. pneumoniae*. Taken together, these results suggest that the most successful procedures for identification of the bacteriocins secreted by *S. infantarius* LP90 are procedures P2 and P3, since they allowed the identification of four bacteriocins (the anionic peptide InfB₁, as well as modified InfA₁, InfB₂, InfG₁) and (InfC₁ and InfG₁, as well as the modified InfA₁, InfB₂), respectively. However, these results do not completely discard the possibility that other infantaricins secreted under this growth conditions could not be detected with the procedures employed, especially considering that all of them were found to be transcribed in the RT-PCR assays. In this respect, the low recovery of the antimicrobial activity initially present in the CFS obtained after the purification of modified InfA₁, InfB₂ and InfG₁ suggests that these antimicrobial peptides are produced at very low levels, which would difficult their recovery after several purification steps, and/or that the purification procedures employed were not optimal. Many challenges are known to be associated with bacteriocin purification (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). For example, it is worth noting that *S. infantarius* LP90 was cultured in MRS, a complex growth medium which

contains large amounts of peptides with molecular masses included in the range of most bacteriocins (3-6 kDa), which could hinder bacteriocin purification (Yang and Ray, 1994; Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Likewise, due to the highly heterogeneous nature of bacteriocins, it is difficult to find a standard purification method which works adequately for all of them, especially if such a high number of peptides are produced simultaneously. On the other hand, it is possible that not all the putative bacteriocins encoded by *S. infantarius* LP90 were produced despite all of them were found to be transcribed. In this respect, there are several factors that could be responsible for this observation, such as mRNA and protein stability and protein modification. Concerning the latter, some of the bacteriocins produced by *S. infantarius* LP90 could have undergone modifications which would preclude their identification by MALDI-TOF MS. Interestingly, two InfA₁ variants (3,963 and 3,357 Da) seem to be secreted by *S. infantarius* LP90. On one hand, modified InfA₁ (3,963 Da) shows anti-pneumococcal activity despite the fact that its molecular mass does not coincide with the predicted one (3,357 Da); on the other hand, the partially purified fraction containing InfA₁ with the predicted molecular mass does not show inhibitory activity against *S. pneumoniae*. From these observations, three hypotheses could be proposed: (i) InfA₁ (3,963 Da) is somehow modified or bonded with an unknown molecule which may confer anti-pneumococcal activity to the resulting peptide; (ii) the amount of InfA₁ (3,357 Da) produced and/or secreted by *S. infantarius* LP90 is not enough to inhibit *S. pneumoniae*, while the amount of InfA₁ (3,963 Da) would be higher and thus it would permit to detect its anti-pneumococcal activity. In this case, the hypothetical modification of InfA₁ would not be positively involved in the anti-pneumococcal activity, and (iii), considering that InfA₁ and InfA₂ seem to constitute a two-peptide bacteriocin system which might act cooperatively (as shown in Chapter V and VI), InfA₂ would be present in the same purification fraction as InfA₁ (3,963 Da) in an amount necessary to confer anti-pneumococcal activity but not sufficient to be identified by MALDI-TOF MS. Moreover, as InfA₁ (3,963Da), InfA₂ could also have a modified molecular mass which would hinder its identification in this fraction.

In conclusion, the experiments carried out in this work revealed that: (i) a 17,730-bp multibacteriocinogenic cluster consisting of 29 *orfs* including the genes encoding 7 new putative class II-bacteriocins (InfA [InfA₁-InfA₂], InfB [InfB₁-InfB₂], InfC [InfC₁-InfC₂], InfD [InfD₁-InfD₂], InfE, InfF and InfG [InfG₁-InfG₂]), as well as the proteins tentatively involved in their secretion, immunity and transcriptional regulation, is present in *S. infantarius* LP90; (ii) in addition to the previously characterized anti-pneumococcal bacteriocin InfA₁, at least four more biologically active antimicrobial peptides, InfB₁, InfB₂, InfC₁ and InfG₁, which lack antimicrobial activity against *S. pneumoniae*, are also secreted by this multibacteriocinogenic strain, and (iii), the anti-pneumococcal activity of *S. infantarius* LP90 seems to be due, at least, to modified InfA₁ (3,963Da), which shows a molecular mass approximately 600 Da higher than its predicted one.

VI.6. REFERENCES

- Balakrishnan, M., R. S. Simmonds, A. Carne, and J. R. Tagg. 2000. *Streptococcus mutans* strain N produces a novel low molecular mass non-lantibiotic bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 83: 165-169.
- Carolissen-Mackay, V., G. Arendse, and J. W. Hastings. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.*, 34: 1-16.
- Chikindas, M. L., J. Novak, A. J. Driessen, W. N. Konings, K. M. Schilling, and P. W. Caufield. 1995. Mutacin II, a bactericidal antibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 2656-2660.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806-6814.
- Citti, R. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- De Saizieu, A., C. Gardes, N. Flint, C. Wagner, M. Kamber, T. J. Mitchell, W. Keck, K. E. Amrein, and R. Lange. 2000. Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J. Bacteriol.*, 182: 4696-4703.
- Diep, D. B., L. S. Håvarstein, and I. F. Nes. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, 178: 4472-4703.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo, and I. F. Nes. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 2384-2389.
- Field, D., M. Begley, P. M. O'Connor, K. M. Daly, F. Hugenholtz, P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross. 2012. Bioengineered nisin A derivatives with enhanced activity against both gram positive and gram negative pathogens. *Plos One*, 7: 46884.
- Fontaine, L., C. Boutry, E. Guédon, A. Guillot, M. Ibrahim, B. Grossiord, and P. Hols. 2007. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, 189: 7195-7205.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 293-310.
- Georgalaki, M. D., E. Van der Berghe, D. Kritikos, B. Devreese, J. Van Beeumen, G. Kalantzopoulus, L. De Vuyst, and E. Tsakalidou. 2002. Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5891-5903.
- Georgalaki, M., K. Papadimitriou, R. Anastasiou, B. Pot, G. Van Driessche, B. Devreese, and E. Tsakalidou. 2013. Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food Microbiol.*, 33:124-130.
- Hale, J. D., Y. T. Ting, R. W. Jack, J. R. Tagg, and N. C. Heng. 2005. Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 7613-7617.

- Hidalgo-Grass, C., M. Ravins, M. Dan-Goor, J. Jaffe, A. E. Moses, and E. Hanski.** 2002. A locus of group A *Streptococcus* involved in invasive disease and DNA transfer. *Mol. Microbiol.*, 46: 87-99.
- Hillman, J. D., J. Novak, E. Sagura, J. A. Gutierrez, T. A. Brooks, P. J. Crowley, M. Hess, A. Azizi, K. Leung, D. Cvitkovitch, and A. S. Bleiweis.** 1998. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 66: 2743-2749.
- Holo, H., O. Nissen, and I. F. Nes.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, 173: 3879-3887.
- Hyink, O., M. Balakrishnan, and J. R. Tagg.** 2005. *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 252: 235-241.
- Kjos, M., L. Snipen, Z. Salehian, I. F. Nes, and D. B. Diep.** 2010. The abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J. Bacteriol.*, 192: 2068-2076.
- Marciset, O., M. C. Jeronimus-Stratingh, B. Mollet, and B. Poolman.** 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, 272: 14277-14284.
- Mota-Meira, M., C. Lacroix, G. LaPointe, and M. C. Lavoie.** 1997. Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett.*, 410: 275-279.
- Nes, I. F. and V. G. H. Eijsink.** 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In: “*Cell-Cell Signaling in Bacteria*”, pp. 175-192. Dunny, G. M. and S. C. Winans (eds.). American Society for Microbiology, Washington D.C., USA.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 113-128.
- Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge, and J. Nissen-Meyer.** 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. In: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 81-115. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA.
- Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189: 1189-1198.
- Nissen-Meyer, J., L. S. Håvarstein, H. Holo, K. Sletten, and I. F. Nes.** 1993. Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J. Gen Microbiol.*, 139: 1503-1509.
- Nissen-Meyer, J., C. Oppegard, P. Rogne, H. S. Haugen, and P. E. Kristiansen.** 2010. Structure and mode-of-action of the two-peptide (Class IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob. Prot.*, 2: 52-60.
- Qi, F., P. Chen, and P. W. Caufield.** 1999. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3880-3887.
- Qi, F., P. Chen, and P. W. Caufield.** 2000. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3221-3229.

- Qi, F., P. Chen, and P. W. Caufield.** 2001. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 15-21.
- Ross, K. F., C. W. Ronson, and J. R. Tagg.** 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic Salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2014-2021.
- Skaugen, M., L. M. Cintas, and I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225-260. Wood, B. J. B. and P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Tagg, J. R.** 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-streptococcus pyogenes bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J. Med. Res.*, 119: 13-16.
- Van der Ploeg, J. R.** 2005. Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. *J. Bacteriol.*, 187: 3980-3989.
- Venema, K., R. E. Haverkort, T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, L. D. Leij, G. Venema, and J. Kok.** 1994. Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol. Microbiol.*, 14: 521-532.
- Wescombe, P. A., M. Upton, K. P. Dierksen, N. L. Ragland, S. Sivabalan, R. E. Wirawan, M. A. Inglis, C. J. Moore, G. V. Walker, C. N. Chilcott, H. F. Jenkinson, and J. R. Tagg.** 2006. Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:1459-1466.
- Whitford, M. F., M. A. McPherson, R. J. Forster, and R. M. Teather.** 2001. Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 569-574.
- Wirawan, R. E., N. A. Klesse, R. W. Jack, and J. R. Tagg.** 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1148-1156.
- Xiao, H., X. Chen, M. Chen, S. Tang, X. Zhao, and L. Huan.** 2004. Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*, 150: 103-108.
- Yang, R. and B. Ray.** 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, 11: 281-291.

CAPÍTULO V

Producción heteróloga de las infantaricinas A₁ y A₂ por
Pichia pastoris y *Lactococcus lactis*

CHAPTER V

Heterologous production of infantaricins A₁ and A₂ by
Pichi pastoris and Lactococcus lactis

V.1. ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a frequent cause of potentially life-threatening infections worldwide. Treatment of the diseases caused by this bacterium is challenging due to the emergence of (multi)drug-resistant *S. pneumoniae* phenotypes, thus there is a need for the development of new antimicrobials active against this species that could be used in clinical settings. In this context, bacteriocins, defined as ribosomally-synthesized antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria (LAB) and other bacteria, may constitute an alternative or complement to the traditional antibiotic therapy. The multibacteriocinogenic strain *Streptococcus infantarius* LP90, isolated from water-buffalo milk, displays a broad and strong antimicrobial spectrum against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* (Chapter III). This anti-pneumococcal activity could be due to modified infantaricin A₁ (InfA₁) (3,963Da) and/or to the action of two peptides, InfA₁ and infantaricin A₂ (InfA₂), which seems to constitute a two-peptide bacteriocin system termed infantaricin A (InfA) whose structural genes, included in a 17,730-bp multibacteriocinogenic cluster, are located *in tandem* (Chapter IV). In this respect, the main goals of this work were the evaluation of *Pichia pastoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* as hosts for the heterologous production of InfA₁ and InfA₂, as well as the evaluation of the antimicrobial activity of both peptides assayed independently and combined (1:1 ratio) against *S. pneumoniae* to determine if they constitute a two-peptide bacteriocin system. For this purpose, the structural genes of InfA₁ (*infA₁*) and InfA₂ (*infA₂*), fused to the *Saccharomyces cerevisiae* gene region encoding the mating pheromone α -factor 1 secretion signal (*MF α 1_s*), were cloned in the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZ α A under control of the methanol-inducible alcohol oxidase promoter (*P_{AOX1}*), generating the plasmids pPIA₁ and pPIA₂, respectively. These recombinant plasmids were further integrated into the genome of *Pc.pastoris* X-33 resulting in *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂. For InfA₁ and InfA₂ purification, cell-free supernatants (CFSs) of the corresponding recombinant yeasts obtained at 24, 48, 72, and 96 h of growth after induction of gene expression with methanol were subjected to a multichromatographic purification procedure. Only the fractions obtained from the hydrophobic interaction chromatography step from *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂ grown for 24, 48, 72 and 96 h after induction displayed antimicrobial activity against the indicator microorganism *Pediococcus acidilactici* CECT4797, showing a maximum at 72 h. However, anti-pneumococcal activity was only detected when the fractions containing InfA₁ and InfA₂ were combined in a 1:1 ratio. On the other hand, the use of *L. lactis* as heterologous host for the production of InfA₁ and InfA₂, separately and together, was also evaluated in this work. For this purpose, chimeric genes encoding fusions of the signal peptide of the Usp45 protein (SP_{Usp45}) to mature InfA₁ and InfA₂ were cloned, separately and together, along with three infantaricins putative immunity proteins (*orf9*, *orf10* and *orf11*) (Chapter IV), referred herein as *infIs*: *infI1*, *infI2* and *infI3*, into the pMG36c expression vector under control of the constitutive promoter P₃₂, generating pMIA₁ and pMIA₂, and pMIA₁A₂, respectively.

These plasmids were transformed into *L. lactis* NZ9000, resulting in several recombinant strains which were selected for further characterization. Mass spectrometry analyses of the fractions obtained from the CFSs of these recombinant strains by a multichromatographic purification procedure showed that peptides with the predicted molecular masses were not present in these fractions. Nevertheless, the peptides purified from *L. lactis* NZ9000-IA₁ and *L. lactis* NZ9000-IA₂ respectively, inhibited *S. pneumoniae* when combined in a 1:1 ratio. Moreover, the purified fractions obtained from *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂, which hypothetically produces both peptides at equimolar amounts, also showed anti-pneumococcal activity.

V.2. INTRODUCTION

Many lactic acid bacteria (LAB) secrete ribosomally-synthesized peptides, known as bacteriocins, characterized for displaying antimicrobial activity against pathogenic and/or drug-resistant bacteria, as well as for their lack of toxicity against eukaryotic cells (Cintas *et al.*, 2001; Skaugen *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007; Kjos *et al.*, 2011). These antimicrobial peptides constitute a heterogeneous group which may be divided into three main classes: (i) class I or lantibiotics, containing post-translationally modified amino acids; (ii) class II, comprising non-modified, small and heat-stable peptides; and (iii), class III, consisting of large and heat-labile protein bacteriocins (Nes *et al.*, 1996; Nes and Holo, 2000; Eijsink *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006). Class II bacteriocins may be further grouped into five subclasses: (i) IIa, comprising the pediocin-like bacteriocins characterized by a conserved N-terminal motif (YGN₂GVxC); (ii) IIb, made up of the bacteriocins whose full activity is dependent on the presence of two different peptides; (iii) IIc, containing the leader-less bacteriocins; (iv) IId, including the circular bacteriocins, and (v) IIe, consisting of other peptide-bacteriocins (Garneau *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). Most lantibiotics and class II bacteriocins are synthesized as biologically inactive precursors containing an N-terminal extension of the so-called double-glycine-type (leader sequence) which is cleaved off concomitantly with export across the cytoplasmic membrane by dedicated ATP-binding cassette (ABC) transporters and their accessory proteins (Havarstein *et al.*, 1995). Similarly, it has been demonstrated that secretion of the leader-less bacteriocins EntQ from *Enterococcus faecium* L50 (Cintas *et al.*, 2000) and LsbB from *Lactococcus lactis* BMG-1 (Gajic *et al.*, 2003) is also mediated by ABC-type multidrug resistance (MDR) transporters (Gajic *et al.*, 2003; Criado *et al.*, 2006). However, not all bacteriocins are secreted by ABC-type transporters. In this context, some class II bacteriocins such as enterocin P (EntP) (Cintas *et al.*, 1997) and hiracin JM79 (HirJM79) (Sánchez *et al.*, 2007) contain N-terminal extensions of the so-called Sec-type (signal peptide, SP) which are proteolytically cleaved concomitantly with bacteriocin externalization by the general secretory pathway (GSP) or Sec-dependent pathway (Cintas *et al.*, 1997; Diep and Nes, 2002; Herranz and Driessen, 2005). The Sec system is a universally conserved protein export system that translocates unfolded proteins across the cell membrane via a protein-conducting pore formed

by the SecYEG complex and a molecular motor, the ATPase SecA. Proteins secreted by this system are equipped with an N-terminal SP that functions as target and recognition signal for signal peptidases that remove the SP from the translocated protein, resulting in the extracellular release of the mature protein or peptide (Driessen and Nowen, 2008; Natale *et al.*, 2008).

The frequent use of broad-spectrum antibiotics results in an intensive selection pressure for the acquisition of antibiotic resistance in both pathogenic and commensal bacteria (Walker and Levy, 2001; Riley and Wertz, 2002). Among the alternatives to combat this problem, the use of bacteriocins constitutes an interesting option. In this context, the relatively narrow antimicrobial spectrum of these peptides in comparison with antibiotics, would lead to a reduction in the collateral damage to the commensal microbiota, decreasing the frequency of nosocomial infections and the intensity of selection for antibiotic resistance (Riley and Wertz, 2002; Cotter *et al.*, 2013). However, for the real widespread application of these peptides in clinical settings it is first necessary to produce them at an industrial scale (Gillor and Ghazaryan, 2007). At this respect, important efforts should be carried out to address critical factors involved in the production and purification of these antimicrobial peptides, such as the low yields obtained when purified from their natural producers and the high cost associated with their synthetic production. Therefore, the researching of alternative production systems such as those based on their production by heterologous microbial hosts is necessary. Several reports have described the successful use of yeasts and LAB as heterologous bacteriocin production systems (Schoeman *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2007a, 2007b; Sánchez *et al.*, 2007, 2008; Basanta *et al.*, 2009, 2010; Borrero *et al.*, 2011a,b; Gómez-Sala, 2013). The successful production of heterologous bacteriocins depends on many factors, including proper recombinant cell growth, expression levels, and the existence of posttranslational modification and regulation systems. Likewise, the successful expression of the gene of interest also depends on the correct selection of microbial host and host-encoded genetic elements (Makrides *et al.*, 1996; Gillor *et al.*, 2005). In this context, yeasts offer the ease of microbial growth and gene manipulation of bacteria along with the ability to perform many post-translational modifications (Cereghino and Cregg, 1999; Idiris *et al.*, 2010). Likewise, these organisms also stand out by their rapid growth to high densities, whereas protein secretion simplifies purification (Idiris *et al.*, 2010). Among them, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been frequently used for heterologous protein production. In this system, the genes encoding key enzymes of the methanol-utilization pathway provide inducible promoters for the efficient expression of heterologous DNA sequences (Gellissen and Hollenberg, 1997; Shin and Yoo, 2013). Moreover, *Pc. pastoris* secretes correctly folded proteins into the medium, is capable of performing post-translational modifications and secretes low levels of endogenous proteins, which eases the purification process (Cregg *et al.*, 1987; Shin and Yoo, 2013). On the other hand, the use of LAB as heterologous hosts also offers significant advantages over native systems (Parvez *et al.*, 2006). In this respect, *L. lactis*, which is granted a QPS status, has been extensively used over the last decades as expression system for large-scale production of homologous or heterologous proteins

(Kleerebezem *et al.*, 1997; Kuipers *et al.*, 1997; Kunji *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 2004; Rigoulay *et al.*, 2004). Moreover, *L. lactis* is an attractive vehicle for the clinical delivery of therapeutics (Ng and Sarkar, 2013). Amongst the features that facilitate the use of this host for heterologous protein production are: (i) a relatively simple and well characterized metabolism; (ii) the existence of several completely sequenced lactococcal genomes (Bolotin *et al.*, 2001, 2002; Wegmann *et al.*, 2007), and (iii), the secretion of only one major protein, Usp45, to the medium (Van Asseldonk *et al.*, 1993), which simplifies downstream purification processes and allows an easier large scale-up production process (Mierau *et al.*, 2005a, 2005b).

Streptococcus infantarius LP90, a multibacteriocinogenic strain responsible for producing, at least, five biologically active antimicrobial peptides (infantaricin A₁ [InfA₁], infantaricin B₁ [InfB₁], infantaricin B₂ [InfB₂], infantaricin C₁ [InfC₁] and infantaricin G₁ [InfG₁]) displays a broad and strong antimicrobial spectrum against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. This anti-pneumococcal activity could be due to modified infantaricin InfA₁ (InfA₁) (3,963Da) and/or to the action of two peptides, InfA₁ and infantaricin A₂ (InfA₂), which seem to constitute a two-peptide bacteriocin system termed infantaricin A (InfA) whose structural genes, included in a 17,730-bp multibacteriocinogenic cluster, are located *in tandem* (Chapter IV). Since the purification of these peptides from *S. infantarius* LP90 cell-free culture supernatants (CFSs) is highly complex, heterologous production can be used as an alternative for obtaining sufficient amounts of pure peptides. In this respect, we report herein the evaluation of *Pc. pastoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* as hosts for the heterologous production of InfA₁ and InfA₂, as well as the evaluation of the antimicrobial activity of both peptides assayed independently and combined (1:1 ratio) against *S. pneumoniae* to determine if they constitute a two-peptide bacteriocin system.

V.3. MATERIALS AND METHODS

V.3.1. Microorganisms, plasmids, media and culture conditions

The sources and relevant characteristics of microorganisms and plasmids used in this work are listed in Table V.1. *S. infantarius* LP90 and *Pediococcus damnosus* CECT4797 were grown aerobically in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 30 °C. *S. pneumoniae* 66405 was first inoculated in Columbia agar plates supplemented with horse blood (5%, w/v) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated under aerobic conditions at 37 °C overnight. Subsequently, a loop of bacterial mass was taken from the surface of these plates and transferred to Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid), and incubated under the same conditions for approximately 6 h (OD₆₀₀ of 0.5). *Escherichia coli* JM109 (Promega Corp., Madison, Wis.) recombinants were propagated in Luria Bertani (LB) broth (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Mo.) at 37 °C with shaking (200-250 rpm). Zeocin (Zeo, 25 µg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.) and chloramphenicol (Cm, 25 µg/ml) (Sigma-Aldrich) were added to LB as selective agents for the selection of *E. coli* transformants.

Table V.1. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Source and/or reference ^b
Bacterial strains		
<i>S. infantarius</i> LP90	InfA ₁ , InfB ₁ , InfB ₂ , InfC ₁ and InfG ₁ producer	Citti (2005); Chapter IV
<i>S. pneumoniae</i> 66405	Indicator microorganism, InfA _{1-P} ^s , InfB ₁ ^r , InfB ₂ ^r , InfC ₁ ^r and InfG ₁ ^r	IRYCIS
<i>P. damnosus</i> 4797	Indicator microorganism, InfA _{1-P} ^s , InfB ₁ ^s , InfB ₂ ^s , InfC ₁ ^s and InfG ₁ ^s	CECT
<i>Escherichia coli</i> High Efficiency JM109	Host strain, F: <i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>relA1 supE44</i> Δ(<i>lac-proAB</i>). F': <i>traD36 proAB lacI</i> ^q ZΔ <i>M15</i>	Promega
<i>Ec. coli</i> JM109Ca	<i>Ec. coli</i> JM109 derivative carrying pPICZαA, Zeo ^r	This work
<i>Ec. coli</i> JM109C	<i>Ec. coli</i> JM109 derivative carrying pMG36c, Cm ^r	This work
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BB24	Source of <i>usp45</i>	Cintas <i>et al.</i> (1998)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	Host-strain MG1363 <i>pepN::nisRK</i>	NIZO; Kuipers <i>et al.</i> (1998)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000-C	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000 derivative carrying pMG36c, Cm ^r	This work
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000-I	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000 derivative carrying pMI encoding infantaricins putative immunity proteins (InfI[s]), Cm ^r	This work
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000-IA ₁	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000 derivative carrying pMIA ₁ encoding InfI(s) and InfA ₁ ; InfA ₁ producer, Cm ^r	This work
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000-IA ₂	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000 derivative carrying pMIA ₂ encoding InfI(s) and InfA ₂ ; InfA ₂ producer, Cm ^r	This work
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000-IA ₁ A ₂	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000 derivative carrying pMIA ₁ A ₂ encoding InfI(s), InfA ₁ and InfA ₂ ; InfA ₁ and InfA ₂ producer, Cm ^r	This work
Yeast strains		
<i>P. pastoris</i> X-33	Wild-type host strain for selection on Zeo, Mut ⁺	Invitrogen
<i>Pc. pastoris</i> X-33Ca	<i>Pc. pastoris</i> X-33 derivative carrying pPICZαA, Zeo ^r	This work
<i>Pc. pastoris</i> X-33-A ₁	<i>Pc. pastoris</i> X-33 derivative carrying pPIA ₁ encoding InfA ₁ ; InfA ₁ producer, Zeo ^r	This work
<i>Pc. pastoris</i> X-33-A ₂	<i>Pc. pastoris</i> X-33 derivative carrying pPIA ₂ encoding InfA ₂ ; InfA ₂ producer, Zeo ^r	This work
Plasmids		
pPICZαA	<i>Pc. pastoris</i> 3.6-kb expression and secretion vector carrying a methanol-inducible promoter (P _{AOXI}), 5' <i>AOXI</i> region and <i>MFα1</i> _s , Zeo ^r	Invitrogen
pPIA ₁	pPICZαA derivative carrying the PCR product C (<i>MFα1</i> _s fused to mature <i>infA</i> ₁) under control of P _{AOXI} , Zeo ^r	This work
pPIA ₂	pPICZαA derivative carrying the PCR product F (<i>MFα1</i> _s fused to mature <i>infA</i> ₂) under control of P _{AOXI} , Zeo ^r	This work
pMG36c	pMG36c derivative. <i>L. lactis</i> 3.3-kb expression and secretion vector carrying the constitutive promoter P ₃₂ , Cm ^r	RUG-MG (Van de Guchte <i>et al.</i> , 1989)
pMI	pMG36c derivative carrying the PCR product I (encoding the infantaricins putative immunity proteins [<i>infI</i> s]) under control of P ₃₂	This work
pMIA ₁	pMI derivative carrying the PCR product L (encoding SP _{Usp45} fused to mature <i>infA</i> ₁) under control of P ₃₂ , Cm ^r	This work
pMIA ₂	pMI derivative carrying the PCR product O (encoding SP _{Usp45} fused to mature <i>infA</i> ₂) under control of P ₃₂ , Cm ^r	This work
pMIA ₁ A ₂	pMIA ₂ derivative carrying the <i>SacI/SphI</i> fragment containing the SP _{Usp45} fused to mature <i>infA</i> ₁ under control of P ₃₂ , Cm ^r	This work

^aInfA_{1-P}^s, susceptibility to InfA₁ purified from *S. infantarius* LP90; InfB₁^r and InfB₁^s, resistance and susceptibility, respectively, to InfB₁ purified from *S. infantarius* LP90; InfB₂^r and InfB₂^s, resistance and susceptibility, respectively, to InfB₂ purified from *S. infantarius* LP90; InfC₁^r and InfC₁^s, resistance and susceptibility, respectively, to InfC₁ purified from *S. infantarius* LP90; InfG₁^r and InfG₁^s, resistance and susceptibility, respectively, to InfG₁ purified from *S. infantarius* LP90; MFα1_s, yeast gene region encoding the mating pheromone α-factor 1 secretion signal; Zeo^r, zeocin resistance; Mut⁺, methanol utilization plus; Cm^r, chloramphenicol resistance. ^bAbbreviations: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); IRYCIS, Servicio de Microbiología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (Madrid, Spain); NIZO, Department of Biophysical Chemistry, Food Research (Ede, The Netherlands); RUG-MG, Department of Molecular Genetics, University of Groningen (Haren, The Netherlands).

Pc. pastoris X-33 (Invitrogen) was cultured in YPD broth (10 g/l yeast extract, Oxoid; 20 g/l peptone, Oxoid; 20 g/l glucose, Panreac Química S. A., Barcelona, Spain) (Beaulieu *et al.*, 2005) at 30 °C with shaking (200-250 rpm). The plasmid pPICZαA, containing a methanol-inducible promoter (P_{AOXI}) and a Zeo resistance marker, was used as expression and secretion vector. Yeast transformants were selected in YPD agar supplemented with Zeo (100 µg/ml) and sorbitol (1 M) (Sigma-Aldrich) at 30 °C for 48 h. Lactococcal strains were grown aerobically in M17 broth (Oxoid) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17) at 30 °C. The plasmid pMG36c, containing the constitutive promoter P₃₂ and a Cm resistance marker (Van de Guchte *et al.*, 1989), was used as expression and secretion vector. *L. lactis* transformants were selected on SGM17 agar (M17 supplemented with 0.5% [w/v] glucose and 0.5 M sucrose) and Cm (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich) plates at 30 °C for 24 h. Solid media contained 1.5% (w/v) agar (Oxoid).

V.3.2. Basic genetic techniques and enzymes

Total genomic DNA from *S. infantarius* LP90, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BB24 and recombinant yeasts was isolated with the Wizard Genomic DNA Purification kit as recommended by the manufacturer (Promega). Plasmid DNA isolation from *Ec. coli* JM109 and *L. lactis* NZ9000 recombinants was carried out using the High Pure Plasmid Isolation kit (Roche Diagnostics S. L., Madrid, Spain), including a pre-treatment with lysozyme (40 mg/ml) (Sigma-Aldrich) and mutanolysin (500 U/ml) (Sigma-Aldrich) at 37 °C for 10 min for lactococcal cells. DNA restriction enzymes (New England Biolabs Inc., Beverly, Mass.), and T4 DNA ligase (Promega) were used according to the supplier's instructions. *Ec. coli* JM109 competent cells (Promega) were chemically transformed as suggested by the manufacturer. Competent *Pc. pastoris* X-33 cells, obtained as recommended by the supplier, and *L. lactis* NZ9000 cells, obtained as described by Holo and Nes (1989), were transformed by electroporation with a Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories S.A., Madrid, Spain) using 2.5 kV, 400 W and 25 µF, and 2.5 kV, 200 W and 25 µF, respectively.

V.3.3. PCR and nucleotide sequencing

Oligonucleotide primers used in this work (Table V.2) were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). PCR amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures containing 300-500 ng of purified DNA, 70 pmol of each primer, 0.3 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), and 1 U of Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97 °C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 45 s), annealing (at an appropriate temperature for 30 s), and elongation (68 °C for 30 s to 2 min and 30 s), ending with a final extension step at 68 °C for 10 min in an Eppendorf Mastercycler DNA thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplified PCR products were resolved by electrophoresis through agarose (2%, w/v) (Pronadisa) gels stained with Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA), and analyzed with the Gel Doc 1000

Table V.2. Primers and PCR products used in this study.

Primer or PCR product	Nucleotide sequence ^a (5'-3') or description	Fragment(s) amplified
Primers		
α -F- <i>Hind</i> III	TGAC CAAGCTT TTGATTTTAACGACTTTTAACGAC	A, C, D, and F
Kex-R-InfA ₁	ATAAAGGTCATCTCTTTCTCGAGAGATACCCC	A
InfA ₁ -F-Kex	CTCGAGAAAAGAGATGACCTTTATAAATTAGTAATC	B
InfA ₁ -R- <i>Kpn</i> I	ATCAG GTACC CTAGCATTACCTCTGTATTTTTC	B and C
Kex-R-InfA ₂	TGTGATGTTGTCTCTTTCTCGAGAGATACCCC	D
InfA ₂ -F-Kex	CTCGAGAAAAGAGACAACATCACAAAGGG	E
InfA ₂ -R- <i>Kpn</i> I	ATCAG GTACC CTTAAAATAATTTTCCAACGCTTTTC	E and F
5AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	G and H
3AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	G and H
pImm-F- <i>Sal</i> I	CATAG TCGAC TGTAAGGAGGATTTTGAAATGCTAAGTAGAATTTATCAGAAC	I
pImm-R- <i>Sph</i> I	CATAG CATGC TTAAACATAAAGCCGCTTACC	I
Usp45-F- <i>Sac</i> I	CATAG AGCTC TGTAAGGAGGATTTTGAAATGAAAAAAGATTATCTCAGCTAT	J and L
Usp45-R-InfA ₁	AAGGTCATCAGCGTAGACCCCTGAC	J
InfA ₁ -F-Usp45	GGTCTACGCTGATGACCTTTATAAATTAGTCAATC	K
InfA ₁ -R- <i>Xma</i> I	CATAC CCGGG CTAGCATTACCTCTGTATTTTTC	K and L
Usp45-F- <i>Xma</i> I	CATAC CCGGG TGTAAGGAGGATTTTGAAATGAAAAAAGATTATCTCAGCTAT	M and O
Usp45-R-InfA ₂	GATGTTGTCAGCGTAGACCCCTGAC	M
InfA ₂ -F-Usp45	GTCTACGCTGACAACATCACAAAGG	N
InfA ₂ -R- <i>Xba</i> I	CATAT CTAGAT TAAAATAATTTTCCAACGCTTTTC	N and O
MGL-F	TGGATTTTGTGAGCTTGACTAG	P, Q, and R
MGL-R	CCTTTGTCGCTAGTACCGGTTG	P, Q, and R
PCR products		Primers used
Fragment A	327-bp <i>Hind</i> III fragment containing the Kex2 cleavage site of MF α I _s and the first four amino acids of the mature InfA ₁	α -F- <i>Hind</i> III/Kex-R-InfA ₁
Fragment B	92-bp <i>Kpn</i> I fragment containing the nucleotides encoding the complete mature InfA ₁ (<i>infA</i> ₁) preceded by the Kex2 cleavage site	InfA ₁ -F-Kex/InfA ₁ -R- <i>Kpn</i> I
Fragment C	419-bp <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I fragment containing the MF α I _s fused to mature InfA ₁	α -F- <i>Hind</i> III/InfA ₁ -R- <i>Kpn</i> I
Fragment D	327-bp <i>Hind</i> III fragment containing the Kex2 cleavage site of MF α I _s and the first four amino acids of InfA ₂	α -F- <i>Hind</i> III/Kex-R-InfA ₂
Fragment E	89-bp <i>Kpn</i> I fragment containing the nucleotides encoding the complete mature InfA ₂ (<i>infA</i> ₂) preceded by the Kex2 cleavage site	InfA ₂ -F-Kex/InfA ₂ -R- <i>Kpn</i> I
Fragment F	416-bp <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I fragment containing the MF α I _s fused to mature InfA ₂	α -F- <i>Hind</i> III/InfA ₂ -R- <i>Kpn</i> I
Fragment G	680-bp fragment containing the MF α I _s fused to mature InfA ₁	5AOX1/3AOX1
Fragment H	677-bp fragment containing the MF α I _s fused to mature InfA ₂	5AOX1/3AOX1
Fragment I	1,932-bp <i>Sal</i> I/ <i>Sph</i> I fragment containing the infantaricins putative immunity proteins (<i>infls</i>)	pImm-F- <i>Sal</i> I/pImm-R- <i>Sph</i> I
Fragment J	108-bp <i>Sac</i> I fragment containing the Usp45 signal peptide (SP _{Usp45}) and the first four N-terminal amino acids of the mature InfA ₁	Usp45-F- <i>Sac</i> I/Usp45-R-InfA ₁
Fragment K	102-bp <i>Xma</i> I fragment containing mature InfA ₁ preceded by the last four amino acids of the SP _{Usp45}	InfA ₁ -F-Usp45/InfA ₁ -R- <i>Xma</i> I
Fragment L	192-bp <i>Sac</i> I/ <i>Xma</i> I fragment containing the SP _{Usp45} fused to mature InfA ₁	Usp45-F- <i>Sac</i> I/InfA ₁ -R- <i>Xma</i> I
Fragment M	108-bp <i>Xma</i> I fragment containing the Usp45 signal peptide (SP _{Usp45}) and the first four N-terminal amino acids of the mature InfA ₂	Usp45-F- <i>Xma</i> I/Usp45-R-InfA ₂
Fragment N	98-bp <i>Xba</i> I fragment containing mature InfA ₂ preceded by the last four amino acids of the SP _{Usp45}	InfA ₂ -F-Usp45/InfA ₂ -R- <i>Xba</i> I
Fragment O	189-bp <i>Xma</i> I/ <i>Xba</i> I fragment containing the SP _{Usp45} fused to mature InfA ₂	Usp45-F- <i>Xma</i> I/InfA ₂ -R- <i>Xba</i> I
Fragment P	2,378-bp <i>Sac</i> I/ <i>Sph</i> I fragment containing the SP _{Usp45} fused to mature InfA ₁ and the <i>InfI</i> (s)	MGL-F/MGL-R
Fragment Q	2,367-bp <i>Xma</i> I/ <i>Sph</i> I fragment containing the SP _{Usp45} fused to mature InfA ₂ and the <i>InfI</i> (s)	MGL-F/MGL-R
Fragment R	2,559-bp <i>Sac</i> I/ <i>Sph</i> I fragment containing the SP _{Usp45} fused to mature InfA ₁ , the SP _{Usp45} fused to mature InfA ₂ and the <i>InfI</i> (s)	MGL-F/MGL-R

^aCleavage sites for restriction enzymes are in bold.

documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). The molecular size markers used were Hyperladder II (Bioline, London, UK), 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) and the Supercoiled DNA Ladder (Invitrogen). The PCR products were purified using the NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Service of Parque Científico-UCM (Madrid, Spain).

V.3.4. Evaluation of *Pc. pastoris* as host for the heterologous production of InfA₁ and InfA₂

V.3.4.1. Construction of the recombinant plasmids derived from pPICZαA and transformation in *Ec. coli* JM109 and *Pc. pastoris* X-33

The primers and PCR products used for the construction of recombinant plasmids for the heterologous production of InfA₁ and InfA₂ by *Pc. pastoris* X-33 are listed in Table V.2. Derivatives of plasmid pPICZαA were constructed as follows (Fig. 5.1): primers α-F-*Hind*III and Kex-R-InfA₁ were used for PCR amplification from pPICZαA of a 327-bp fragment (A) containing the nucleotides encoding the Kex2 cleavage site (AAAAGA) of MFα1_s followed by the first four N-terminal amino acids of the mature InfA₁, and primers InfA₁-F-Kex and InfA₁-R-*Kpn*I were used for PCR amplification from total genomic DNA of *S. infantarius* LP90 of a 92-bp fragment (B) containing the nucleotides encoding the complete mature InfA₁ preceded by those encoding the Kex2 cleavage site. Similarly, primers α-F-*Hind*III and Kex-R-InfA₂ and InfA₂-F-Kex and InfA₂-R-*Kpn*I were used for PCR amplification from pPICZαA and total genomic DNA of *S. infantarius* LP90 of a 327- and a 89-bp fragments (D and E, respectively) containing the nucleotides encoding the Kex2 cleavage site followed by the first four N-terminal amino acids of the mature InfA₂, and the nucleotides encoding the complete mature InfA₂ preceded by those encoding the Kex2 cleavage site, respectively. Mixtures of fragments A and B, and D and E were used as templates for PCR amplification of 419- and 416-bp fragments (C and F, respectively) using the primer pairs α-F-*Hind*III/InfA₁-R-*Kpn*I and α-F-*Hind*III/InfA₂-R-*Kpn*I, respectively.

The purified fragments C and F were digested with *Hind*III and *Kpn*I and ligated with T4 DNA ligase into pPICZαA previously digested with the same enzymes, generating the recombinant plasmids pPIA₁ and pPIA₂, respectively. Next, the recombinant plasmids were chemically transformed into *Ec. coli* JM109 competent cells, and the resulting transformants were selected on LB agar with zeocin at 37 °C for 24 h. The plasmid pPICZαA was also transformed into *Ec. coli* JM109, yielding *Ec. coli* JM109-Cα. The presence of the plasmids pPIA₁ and pPIA₂ in the transformed cells was confirmed by: (i) PCR amplification of 419- and 416-bp fragments (C and F, respectively) using *Ec. coli* colonies as DNA template and the primer pairs α-F-*Hind*III/InfA₁-R-*Kpn*I and α-F-*Hind*III/InfA₂-R-*Kpn*I, respectively, and (ii), nucleotide sequencing at the Servicio de Genómica using the recombinant plasmids as DNA templates and the pPICZαA specific primer pairs 5AOX1 and 3AOX1. Subsequently, the recombinant plasmids pPIA₁ and pPIA₂ were linearized with *Sac*I and electroporated into *Pc*.

pastoris X-33 competent cells, and the transformants were selected on YPD agar with Zeo and sorbitol (1 M). The plasmid pPICZαA was also transformed into *Pc. pastoris* X-33 competent cells, yielding *Pc. pastoris* X-33Cα. The presence of the integrated pPIA₁ and pPIA₂ genes in *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂ genome, respectively, was confirmed by PCR amplification using genomic DNA and the specific primer pairs α-F-*Hind*III/InfA₁-R-*Kpn*I and α-F-*Hind*III/InfA₂-R-*Kpn*I, respectively.

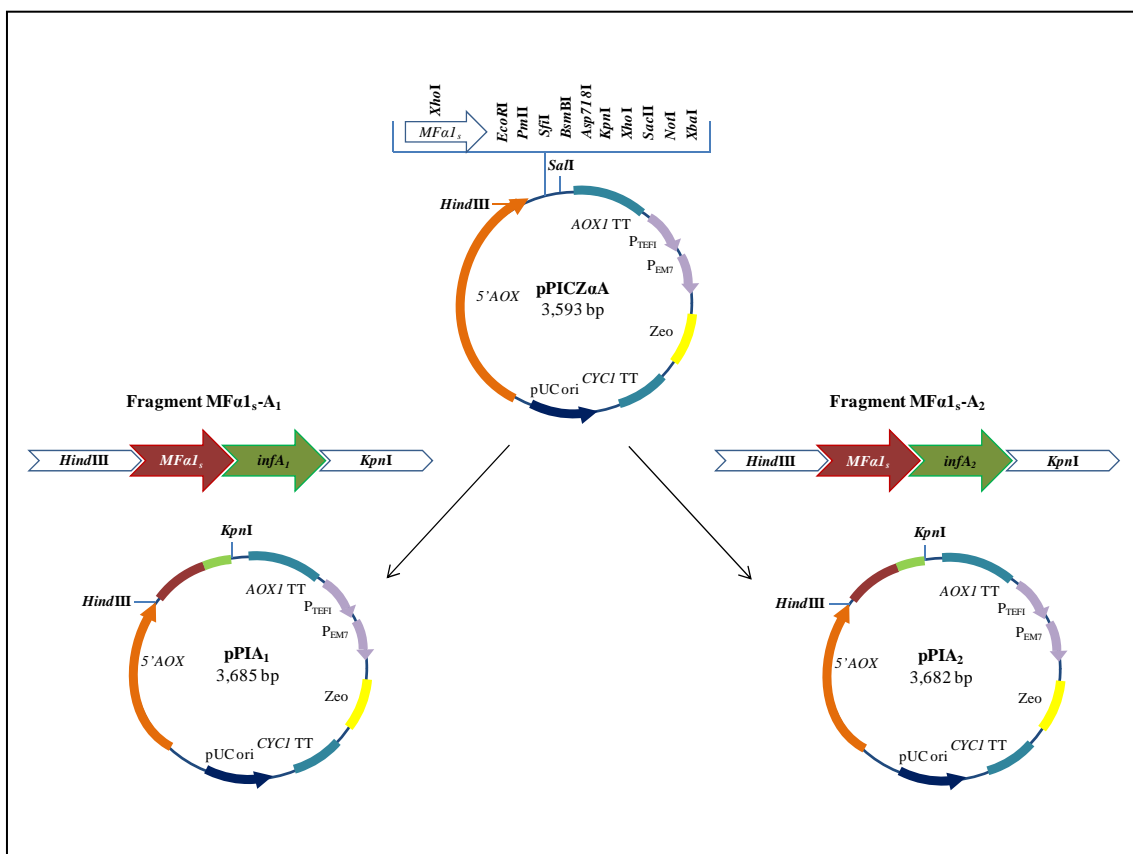


Figure 5.1. Strategy for the construction of the recombinant plasmids pPIA₁ and pPIA₂, derived from pPICZαA. Plasmids sizes are given in base pairs (bp). Only relevant restriction enzymes sites are given. 5' AOXI, promoter region; AOXI TT, transcription termination; P_{TEF1}, transcription elongation factor 1 driving expression of *Sh ble* (zeocin resistance) in *Pc. pastoris*; P_{EM7}, constitutive promoter driving expression of *Sh ble* in *E. coli*; Zeo, zeocin resistance gene (*Sh ble*); CYC1 TT, transcription termination; pUC ori, maintenance and high copy replication origin in *E. coli*; MFα1s, yeast gene region encoding the mating pheromone α-factor 1 secretion signal; *infA₁* and *infA₂*, structural genes of InfA₁ and InfA₂, respectively, lacking the nucleotides encoding their corresponding leader sequences.

V.3.4.2. Detection of antimicrobial activity of the *Pc. pastoris* recombinant strains and partial purification of InfA₁ and InfA₂

Direct antimicrobial activity of several *Pc. pastoris* X-33 transformants hypothetically producing InfA₁ and InfA₂ was screened by a streak-on-agar test (STOAT) essentially as

previously described (Gutiérrez *et al.*, 2005). Briefly, transformants were streaked onto the surface of buffered methanol-complex (BMMY) agar (10 g/l yeast extract; 20 g/l peptone; 100 mM potassium phosphate [pH 6.0] [Merck Farma y Química S. A., Barcelona, Spain]; 1.34% [w/v] yeast nitrogen base without aminoacids [Invitrogen]; 4×10^{-5} % biotin [Sigma-Aldrich]; 0.5% [v/v] methanol [Merck]) and incubated at 30 °C for four days. During the incubation, methanol was daily added to attain a 0.5% (v/v) final concentration to maintain the induction. Then, 40 ml of BHI or MRS soft (0.8% wt/v) agar containing about 1×10^5 cfu/ml of the indicator microorganisms *S. pneumoniae* 66405 or *P. damnosus* CECT4797, respectively, was poured over the plates. After overnight incubation at 37 and 30 °C, respectively, the direct antimicrobial activity was detected by the presence of growth inhibition zones around the spotted transformants. Recombinant strains were selected on the basis of their high Zeo resistance.

InfA₁ and InfA₂ heterologously produced by *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂, respectively, were partially purified essentially as previously described by Cintas *et al.* (1995). Prior to induction, yeast transformants were precultured in buffered glycerol complex (BMGY) broth (10 g/l yeast extract; 20 g/l peptone; 100 mM potassium phosphate [pH 6.0]; 1.34% yeast nitrogen base without aminoacids; 4×10^{-5} % biotin; 1% [v/v] glycerol, Sigma-Aldrich) (Gutiérrez *et al.*, 2005) at 30 °C (OD₆₀₀ of approximately 2-6). Subsequently, cells were harvested by centrifugation, washed with BMGY without glycerol, and resuspended to an OD₆₀₀ of 1 in 400 ml of BMMY broth), and grown at 30 °C with shaking for 24, 48, 72 and 96 h after induction (at time zero). After incubation, cells were removed by centrifugation (12,000 × g at 4 °C for 10 min) and the CFSs were subjected to precipitation with ammonium sulphate (50% [w/v]; Merck). The solutions were stirred for 3 h at 4 °C and centrifuged (12,000 × g at 4 °C for 30 min) again. The precipitated proteins were resuspended in 100 ml of 20 mM of sodium phosphate buffer (pH 6.0) and subsequently desalted by gel filtration (PD-10 columns; GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). The obtained fractions were further subject to cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) and hydrophobic-interaction (Octyl Sepharose CL-4B, GE Healthcare) chromatographies. The antimicrobial activity of the fractions obtained from the hydrophobic interaction chromatographies from *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂ grown for 24, 48, 72 and 96 h after methanol induction was determined by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.* 1995) using *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganisms. To measure the synergistic activity of heterologously produced InfA₁ and InfA₂, the hydrophobic interaction chromatography fractions obtained after 72 h of growth were challenged against these indicators separately and combined in a 1:1 ratio by an ADT.

V.3.5. Evaluation of *L. lactis* NZ9000 as host for the heterologous production of InfA₁ and InfA₂

V.3.5.1. Construction of recombinant plasmids derived from pMG36c and transformation in *Ec. coli* JM109 and *L. lactis* NZ9000

The primers and PCR products used for the construction of recombinant plasmids for the heterologous production of InfA₁ and InfA₂ by *L. lactis* NZ9000 are listed in Table V.2. Derivatives of plasmid pMG36c were constructed as follows (Fig. 5.2): primers pImm-F-*Sal*I and pImm-R-*Sph*I were used for PCR amplification from total genomic DNA of *S. infantarius* LP90 of a 1,932-bp fragment (I) containing *orf9*, *orf10* and *orf11* encoding the infantaricins putative immunity proteins (Chapter IV), referred herein after as *infIs* (*infI1*, *infI2* and *infI3*). On the other hand, primers Usp45-F-*Sac*I and Usp45-R-InfA₁ were used for PCR amplification from total genomic DNA of *L. lactis* BB24 of a 108-bp fragment (J) containing the nucleotides encoding the signal peptide of the Usp45 protein (SP_{Usp45}) followed by the first four N-terminal amino acids of the mature InfA₁. Subsequently, primers InfA₁-F-Usp45 and InfA₁-R-*Xma*I were used for PCR amplification from total genomic DNA of *S. infantarius* LP90 of a 102-bp fragment (K) containing the nucleotides encoding the mature InfA₁ preceded by those encoding the last four C-terminal amino acids of the SP_{Usp45}. Similarly, primers Usp45-F-*Xma*I and Usp45-R-InfA₂ were used for PCR amplification from total genomic DNA of *L. lactis* BB24 of a 108-bp fragment (M) containing the nucleotides encoding SP_{Usp45} followed by the first four N-terminal amino acids of the mature InfA₂. Primers InfA₂-F-Usp45 and InfA₂-R-*Xba*I were used for PCR amplification from total genomic DNA of *S. infantarius* LP90 of a 98-bp fragment (N) containing the nucleotides encoding the mature InfA₂ preceded by those encoding the last four C-terminal amino acids of the SP_{Usp45}. Mixtures of fragments J and K, and M and N, were used as templates for PCR amplification of 192-bp *Sac*I/*Xma*I and 189-bp *Xma*I/*Xba*I fragments (L and O, respectively), using the primer pairs Usp45-F-*Sac*I/InfA₁-R-*Xma*I, and Usp45-F-*Xma*I/InfA₂-R- *Xba*I, respectively.

The purified fragment I was digested with *Sal*I and *Sph*I and ligated with T4 DNA ligase into pMG36c previously digested with the same enzymes, generating the recombinant plasmid pMI. The recombinant plasmid was chemically transformed into *Ec. coli* JM109 competent cells, and transformants were selected on LB agar with Cm at 37 °C for 24 h. The plasmid pMG36c was also transformed into *Ec. coli* JM109, yielding *Ec. coli* JM109C. The recombinant plasmid pMI was checked by PCR amplification of a fragment of the expected size (1,932-bp) using the insert specific primer pairs pImm-F-*Sal*I and pImm-R-*Sph*I. Subsequently, fragments L and O were digested with *Sac*I and *Xma*I and *Xma*I and *Xba*I, respectively, and ligated into pMI previously digested with the corresponding restriction enzyme pair, generating the recombinant plasmids pMIA₁ and pMIA₂, respectively.

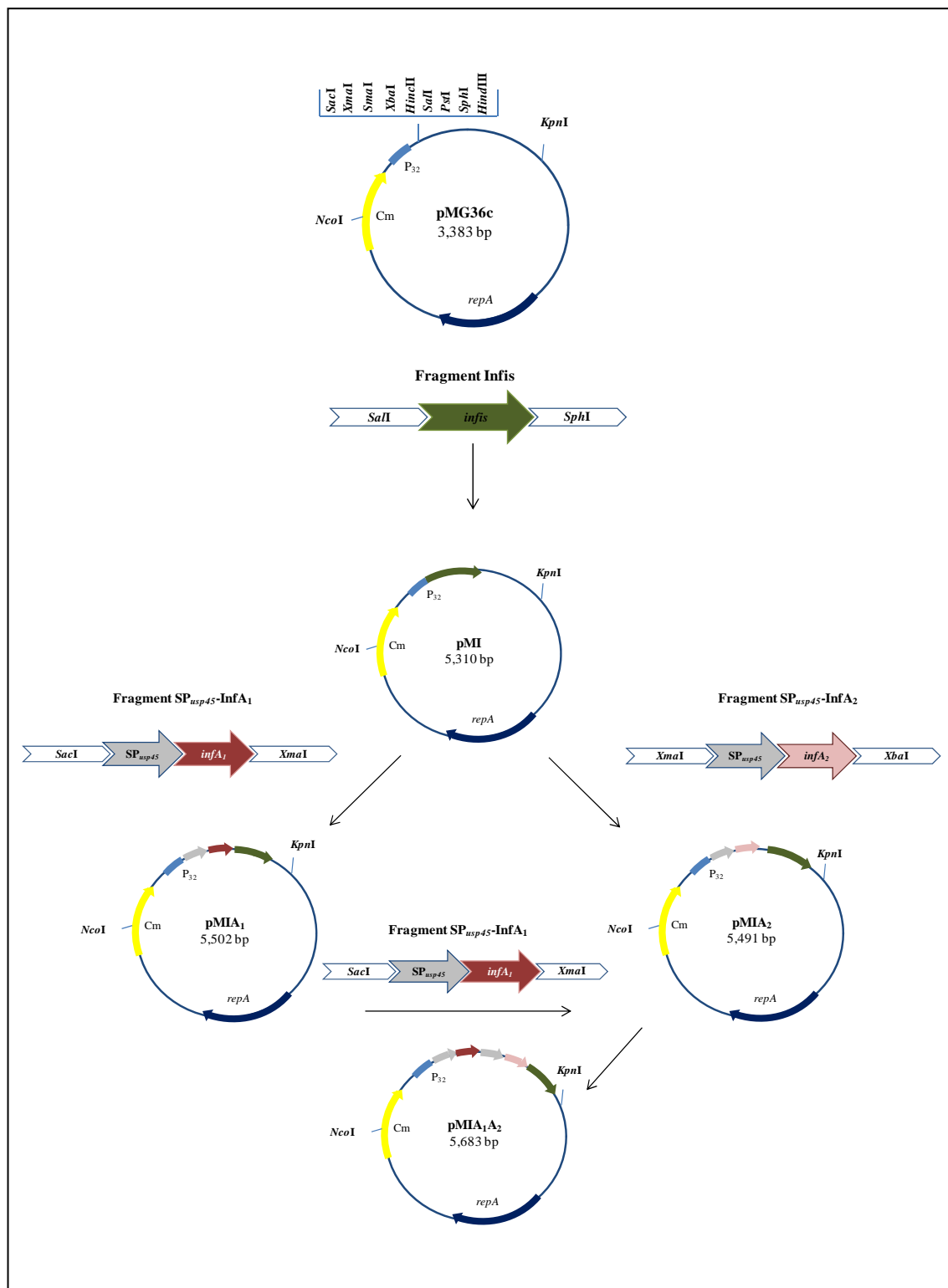


Figure 5.2. Strategy for the construction of the recombinant plasmids pMI, pMIA₁, pMIA₂ and pMIA₁A₂ derived from pMG36c. Plasmid sizes are given in base pairs (bp). Only restriction enzymes sites relevant for cloning are shown. P₃₂, constitutive promoter; *repA*, plasmid replication gene; *Cm*, chloramphenicol resistance gene; *infIs*, infantaricins putative immunity proteins; SP_{usp45}, signal peptide of the Usp45 protein of *L. lactis*; *infA₁* and *infA₂*, structural genes of InfA₁ and InfA₂, respectively, lacking the nucleotides encoding their corresponding leader sequences.

Transformation and selection of the transformants were carried out as described above. Finally, the recombinant plasmid pMIA₁ was digested with *Sac*I and *Xma*I, and the resulting product (SP_{usp45} fused to mature infA₁) was ligated into pMIA₂ previously digested with the same enzymes, generating the recombinant plasmid pMIA₁A₂. This recombinant plasmid was transformed into *Ec. coli* JM109, and the transformants were selected on LB agar with Cm at 37 °C for 24 h. The presence of plasmids pMIA₁, pMIA₂, and pMIA₁A₂ in the corresponding recombinants was confirmed by: (i) PCR amplification of 2,378-, 2,367- and 2,559-bp fragments (P, Q and R, respectively) using *Ec. coli* colonies as DNA template and the pMG36c specific primer pairs MGL-F and MGL-R, and (ii), nucleotide sequencing using the same primer pairs at the Servicio de Genómica. Subsequently, each recombinant plasmid was transformed into *L. lactis* NZ9000 competent cells, and transformants were selected onto GM17 agar with Cm after incubation at 30 °C for 24 h. The plasmid pMG36c was also transformed into *L. lactis* NZ9000, yielding *L. lactis* NZ9000C. The presence of the recombinant plasmids pMIA₁, pMIA₂ and pMIA₁A₂ in the recombinant *L. lactis* NZ9000 hosts were checked by PCR amplification as described above.

V.3.5.2. Detection of antimicrobial activity of the *L. lactis* recombinant strains and purification and mass spectrometry analysis of InfA₁ and InfA₂

Detection of direct antimicrobial activity of individual colonies of lactococcal recombinants was performed by a stab-on agar-test (SOAT) using a modification of the method described by Cintas *et al.* (1995). Briefly, bacterial transformants were stabbed onto GM17 agar supplemented with Cm and incubated at 30 °C for 5 h. Subsequently, 40 ml of BHI or MRS soft agar containing about 1×10⁵ CFU/ml of the indicator microorganisms *S. pneumoniae* 66405 or *P. damnosus* CECT4797, respectively, was poured over the plates. After incubation at 30 °C for 16-24 h, the plates were checked for growth inhibition zones around the stabbed colonies. Lactococcal recombinants containing pMIA₁, pMIA₂ and pMIA₁A₂ were randomly selected after confirming the correct nucleotide sequence of their recombinant plasmids.

InfA₁ and InfA₂ separately produced by *L. lactis* NZ9000-IA₁ and *L. lactis* NZ9000-IA₂, respectively, and co-produced by *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂ were purified essentially as described above. Briefly, each recombinant preculture was used to inoculate 1-liter of GM17 broth which was further incubated at 30 °C under aerobic conditions for 16 h. After the cells were removed by centrifugation (12,000 × *g* at 4 °C for 10 min), the CFSs were subjected to ammonium sulphate precipitation, and gel filtration, cation-exchange and hydrophobic-interaction chromatographies. Finally, the obtained fractions were further purified by reverse-phase chromatography (PepRPC HR 5/5, GE Healthcare) in a fast protein liquid chromatography system (AKTA-FPLC Purifier, GE Healthcare). The antimicrobial activity of the fractions obtained during the purification procedure was determined by a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000) using *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganisms. Fractions displaying a high and specific bacteriocin activity were

pulled together and rechromatographed on the same reverse-phase column until chromatographically pure bacteriocins were obtained. Subsequently, to measure the synergistic activity of InfA₁ and InfA₂ heterologously produced by *L. lactis* NZ9000-IA₁ and *L. lactis* NZ9000-IA₂, respectively, the purified fractions were challenged against the same indicators separately and combined in a 1:1 ratio by an ADT. Finally, the molecular mass of the purified peptides was analyzed by mass spectrometry using a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Voyager-DE STR mass spectrometer (MALDI-TOF MS) at the Mass Spectrum Service of Parque Científico-UCM (Madrid, Spain).

V.4. RESULTS

V.4.1. Cloning of *infA*₁ and *infA*₂ in the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZaA

Both PCR analysis and nucleotide sequencing confirmed the correct construction of the recombinant plasmids pPIA₁ and pPIA₂ (results not shown). These plasmids carry the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site (AAAAGA) of *MFα1s* from *Pc. pastoris*, required for processing of the fusion protein, fused in frame to *infA*₁ and *infA*₂ lacking the nucleotides encoding the leader sequences of InfA₁ and InfA₂, respectively, under control of a methanol-inducible promoter.

V.4.2. Heterologous expression and secretion of biologically active InfA₁ and InfA₂ by recombinant *Pc. pastoris*

Evaluation of direct antimicrobial activity of individual colonies of *Pc. pastoris* recombinant strains by a STOAT showed that none of the assayed colonies exerted antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 or *P. damnosus* CECT4797. Subsequently, recombinant strains selected on the basis of their high Zeo resistance (3,000 and 2,000 µg/ml for *Pc. pastoris* X-33-A₁ [pPIA₁] and *Pc. pastoris* X-33-A₂ [pPIA₂], respectively) were further grown in BMMY broth at 30 °C for 24, 48, 72 and 96 h, and the corresponding CFSs were subjected to partial purification. Antimicrobial activity was neither detected in the CFSs, nor in the fractions obtained from the ammonium sulphate precipitation, and gel filtration and cation-exchange chromatographies. Interestingly, antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 was observed in the elution fraction obtained from the hydrophobic interaction step from *Pc. pastoris* X-33-A₁ obtained at 24, 48, 72, and 96 h after induction. This antimicrobial activity gradually increased from the fraction obtained after 24 h of growth, reaching a maximum after 72 h (Fig. 5.3). However, no anti-pneumococcal activity was detected in any of the fractions evaluated (results not shown). On the other hand, antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 was observed after the hydrophobic interaction step from *Pc. pastoris* X-33-A₂ obtained at 48 and 72 h after induction, but not in those obtained after 24 and 96 h

(Fig. 5.3). As for *Pc. pastoris* X-33-A₁, none of the fractions obtained from *Pc. pastoris* X-33-A₂ showed antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 (results not shown). However, the evaluation of the antimicrobial activity of the fractions containing InfA₁ and InfA₂ obtained from each of the hydrophobic interaction chromatographies and combined in a 1:1 ratio showed that this mixture exerted antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 (Fig. 5.4).

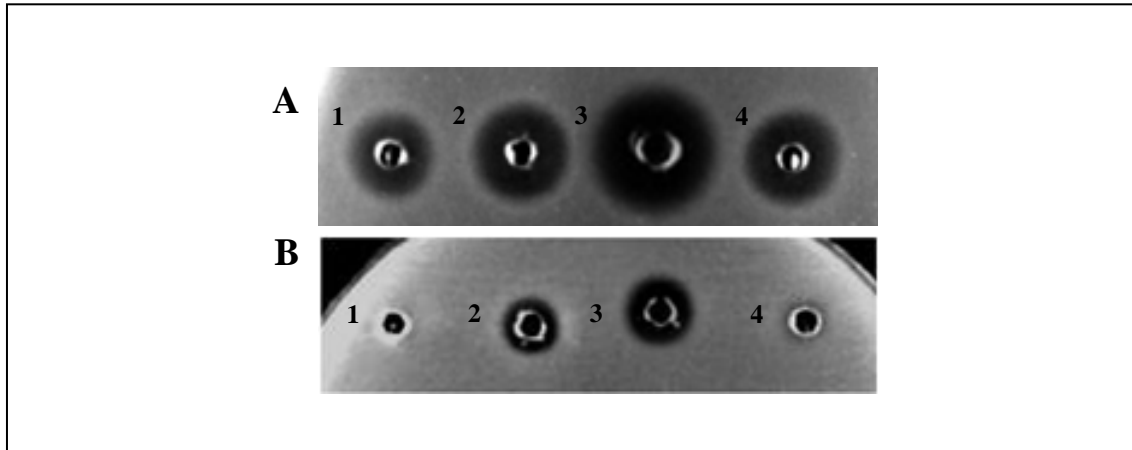


Figure 5.3. Antimicrobial activity of the elution fractions from the hydrophobic interaction chromatography of the CFS of *Pc. pastoris* X-33A₁ and *Pc. pastoris* X-33A₂ against *P. damnosus* CECT4797, as determined by an ADT. A and B: fractions obtained from *Pc. pastoris* X-33A₁ and *Pc. pastoris* X-33A₂, respectively, at 24 (1), 48 (2), 72 (3), and 96 (4) h after induction.

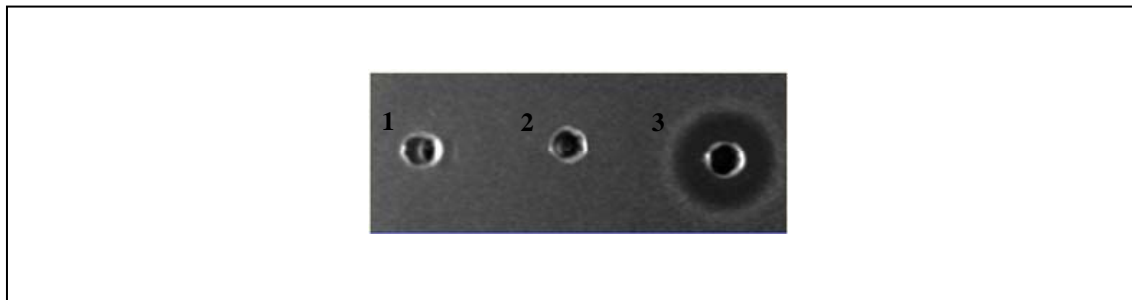


Figure 5.4. Antimicrobial activity of the elution fractions from the hydrophobic interaction chromatography of the CFS of *Pc. pastoris* X-33A₁ and *Pc. pastoris* X-33A₂ against *S. pneumoniae* 66405, as determined by an ADT. *Pc. pastoris* X-33A₁ and *Pc. pastoris* X-33A₂ fractions (1) and (2), respectively, and *Pc. pastoris* X-33A₁ and *Pc. pastoris* X-33A₂ fractions combined in a 1:1 ratio (3).

V.4.3. Cloning of *infA*₁ and *infA*₂ in the *L. lactis* expression and secretion vector pMG36c

PCR analysis and nucleotide sequencing confirmed the correct construction of the recombinant plasmids pMIA₁, pMIA₂ and pMIA₁A₂ (results not shown). These plasmids carry the nucleotides encoding the SP_{Usp45} from *L. lactis*, required for processing of the fusion protein during secretion, fused in frame to *infA*₁ and *infA*₂ together with *infIs*, respectively, lacking the

nucleotides encoding the corresponding leader sequences of InfA₁ and InfA₂, separately and together, respectively, under control of P₃₂.

V.4.4. Heterologous expression and secretion of biologically active InfA₁ and InfA₂ by recombinant *L. lactis*

Evaluation of direct antimicrobial activity of individual colonies of lactococcal recombinants by a SOAT showed that none of the assayed colonies exerted antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 or *P. damnosus* CECT4797. Subsequently, lactococcal recombinants containing pMIA₁, pMIA₂ and pMIA₁A₂ were randomly selected and, after confirming the correct nucleotide sequence of their recombinant plasmids, the corresponding CFSs were subjected to protein purification. The results of these purifications are summarized in Tables V.3, V.4, and V.5, respectively. Regarding *L. lactis* NZ9000-IA₁, antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 was observed after cationic exchange, hydrophobic interaction, and reverse-phase chromatography steps. The last RP-FPLC purification step resulted in two peaks (A1-15 and A1-17) with antimicrobial activity against this same indicator microorganism (Fig. 5.5). The increase in specific antimicrobial activity of A1-15 and A1-17 was 945- and 473.6-fold, respectively, while their total antimicrobial activity represented a recovery of 94.5 and 94.7%, respectively, of the initial antimicrobial activity. Antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 was not detected in any of these fractions (Table V.3).

Table V.3. Purification of InfA₁ produced by *L. lactis* NZ9000-IA₁ grown in GM17 at 30 °C

Supernatant and purification stage	Volume (ml)	Total A ₂₅₄ ^a	Total activity (BU) ^b	Sp act (BU/A ₂₅₄) ^c	Increase in sp act (fold) ^d	Yield (%)
<i>S. pneumoniae</i> 66405						
Culture supernatant	1,000.00	19,400.00	NID	NE	NE	NE
Ammonium sulfate precipitation	100.00	250.00	NID	NE	NE	NE
Gel filtration chromatography	140.00	182.00	NID	NE	NE	NE
Cation-exchange chromatography	50.00	20.00	NID	NE	NE	NE
Hydrophobic-interaction chromatography	10.00	1.00	NID	NE	NE	NE
Reversed-phase chromatography						
Fraction A1-15	0.70	0.02	NID	NE	NE	NE
Fraction A1-17	0.90	0.04	NID	NE	NE	NE
<i>P. damnosus</i> CECT4797						
Culture supernatant	1,000.00	19,400.00	NID	NID	NE	NE
Ammonium sulfate precipitation	100.00	250.00	NID	NID	NE	NE
Gel filtration chromatography	140.00	182.00	NID	NID	NE	NE
Cation-exchange chromatography	50.00	20.00	1,900.00	95.00	1.00	100
Hydrophobic-interaction chromatography	10.00	1.00	1,700.00	1,700.00	17.90	89.50
Reversed-phase chromatography						
Fraction A1-15	0.70	0.02	1,795.00	89,750.00	945.00	94.50
Fraction A1-17	0.90	0.04	1,800.00	45,000.00	473.60	94.70

^aAbsorbance at 254 nm (A₂₅₄) multiplied by the volume in milliliters; ^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml), as determined by an MPA, multiplied by the total volume in milliliters; ^cSpecific antimicrobial activity expressed as the total activity (BU) divided by the total A₂₅₄

^dSpecific antimicrobial activity of a fraction (BU/A₂₅₄) divided by the specific activity of the cation-exchange chromatography (BU/A₂₅₄); NID, no inhibition detected; NE, not evaluable.

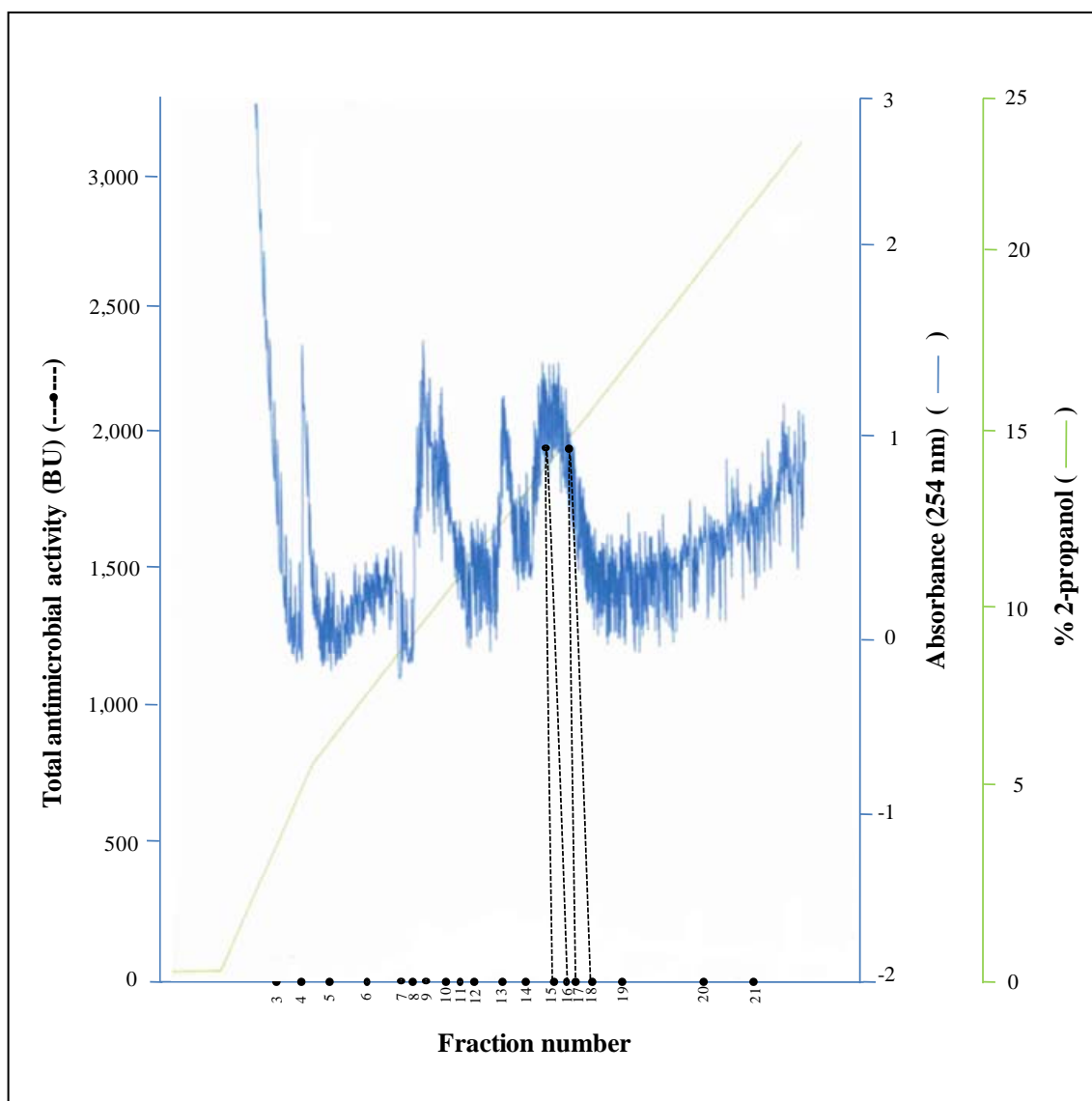


Figure 5.5. RP-FPLC chromatography of the InfA₁ secreted by *L. lactis* NZ9000-IA₁. The black dashed lines indicate the peaks showing bacteriocin activity against *P. damnosus* CECT4797.

Concerning *L. lactis* NZ9000-IA₂, antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 was also observed after cationic exchange, hydrophobic interaction, and reverse-phase chromatography steps. The last RP-FPLC purification step resulted in two peaks (A2-13 and A2-14) with antimicrobial activity against this same indicator microorganism (Fig. 5.6). The increase in specific antimicrobial activity of A2-13 and A2-14 was 1,938- and 2,268-fold, respectively, while their total antimicrobial activity represented a recovery of 176.3 and 247.4%, respectively, of the initial antimicrobial activity. Antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 was not detected in any of these fractions (Table V.4).

Table V.4. Purification of InfA₂ produced by *L. lactis* NZ9000-IA₂ grown in GM17 at 30 °C

Supernatant and purification stage	Volume (ml)	Total A ₂₅₄ ^a	Total activity (BU) ^b	Sp act (BU/A ₂₅₄) ^c	Increase in sp act (fold) ^d	Yield (%)
<i>S. pneumoniae</i> 66405						
Culture supernatant	1,000.00	35,400.00	NID	NE	NE	NE
Ammonium sulfate precipitation	100.00	510.00	NID	NE	NE	NE
Gel filtration chromatography	140.00	406.00	NID	NE	NE	NE
Cation-exchange chromatography	50.00	55.00	NID	NE	NE	NE
Hydrophobic-interaction chromatography	10.00	72.00	NID	NE	NE	NE
Reversed-phase chromatography						
Fraction A2-13	0.50	0.05	NID	NE	NE	NE
Fraction A2-14	0.70	0.06	NID	NE	NE	NE
<i>P. damnosus</i> CECT4797						
Culture supernatant	1,000.00	35,400.00	NID	NID	NE	NE
Ammonium sulfate precipitation	100.00	510.00	NID	NID	NE	NE
Gel filtration chromatography	140.00	406.00	NID	NID	NE	NE
Cation-exchange chromatography	50.00	55.00	25,600.00	465.50	1.00	100.00
Hydrophobic-interaction chromatography	10.00	72.00	22,900.00	318.00	0.70	89.50
Reversed-phase chromatography						
Fraction A2-13	0.50	0.05	45,120.00	902,400.000	1,938.00	176.30
Fraction A2-14	0.70	0.06	63,350.00	1,055,833.00	2,268.00	247.40

^aAbsorbance at 254 nm (A₂₅₄) multiplied by the volume in milliliters; ^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml), as determined by an MPA, multiplied by the total volume in milliliters; ^cSpecific antimicrobial activity expressed as the total activity (BU) divided by the total A₂₅₄

^dSpecific antimicrobial activity of a fraction (BU/A₂₅₄) divided by the specific activity of the cation-exchange chromatography (BU/A₂₅₄); NID, no inhibition detected; NE, not evaluable.

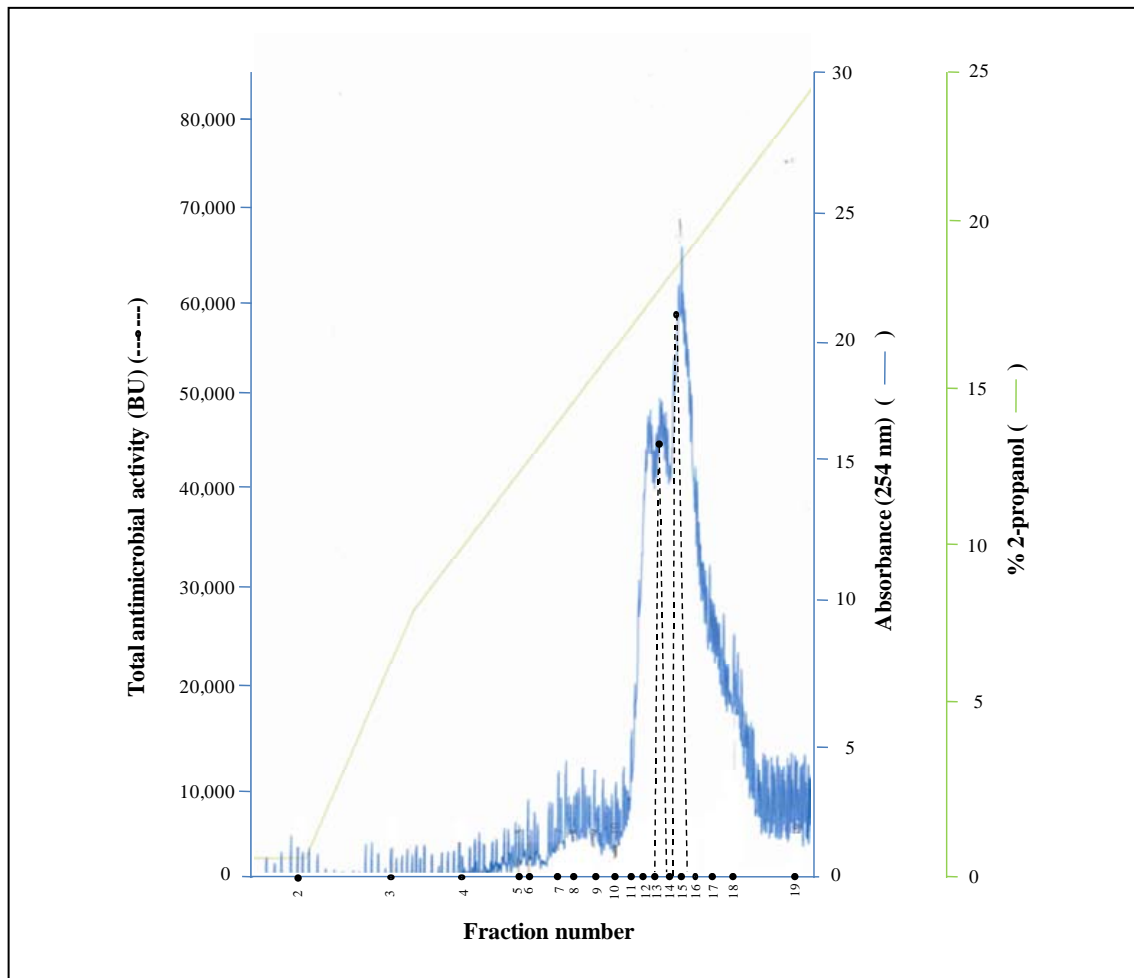


Figure 5.6. RP-FPLC chromatography of the InfA₂ secreted by *L. lactis* NZ9000-IA₂. The black dashed lines indicate the peaks showing bacteriocin activity against *P. damnosus* CECT4797.

Although none of the fractions purified from both *L. lactis* NZ9000-IA₁ and *L. lactis* NZ9000-IA₂ inhibited the pneumococcal growth, the evaluation of the antimicrobial activity of the fractions A1-15 and A2-14 (combined in a 1:1 ratio) determined by an ADT showed that this mixture exerted antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 (Fig.5.7).

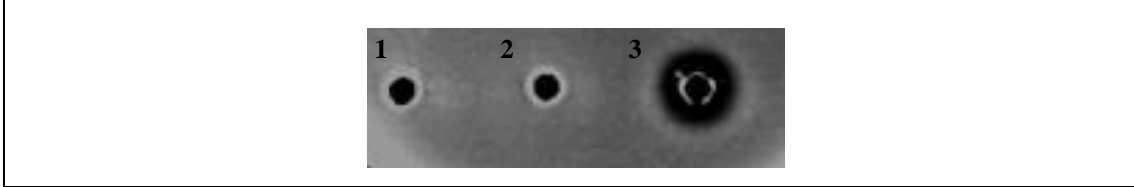


Figure 5.7. Antimicrobial activity of the fractions A1-15 and A2-14 obtained from the last RP-FPLC purification step of CFS of *L. lactis* NZ9000-IA₁ and *L. lactis* NZ9000-IA₂, respectively, against *S. pneumoniae* 66405. Fractions A1-15 and A2-14 (1) and (2), respectively, and fractions A1-15 and A2-14 combined in a 1:1 ratio (3).

Conversely, antimicrobial activity against both *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797 was first observed in the fractions from the gel filtration chromatography step of the ammonium-precipitated CFSs from *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂ (Table V.5). The last RP-FPLC purification step resulted in two peaks, A1A2-9 and A1A2-14, with antimicrobial activity against both indicators (Fig. 5.8). The increase in specific antimicrobial activity of the fraction A1A2-9 against *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797 was 970- and 3,960-fold, respectively, which is higher than that of the gel filtration fraction, representing a recovery of 7 and 28.2%, respectively, of the initial antimicrobial activity. On the other hand, the fraction

Table V.5. Purification of InfA₁ and InfA₂ produced by *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂ grown in GM17 at 30 °C

Supernatant and purification stage	Volume (ml)	Total A ₂₅₄ ^a	Total activity (BU) ^b	Sp act (BU/A ₂₅₄) ^c	Increase in sp act (fold) ^d	Yield (%)
<i>S. pneumoniae</i> 66405						
Culture supernatant	1,000.00	30,300.00	NID	NE	NE	NE
Ammonium sulfate precipitation	100.00	980.00	NID	NE	NE	NE
Gel filtration chromatography	140.00	420.00	28,280.00	67.30	1.00	100.00
Cation-exchange chromatography	50.00	2.50	29,600.00	11,840.00	176.00	104.60
Hydrophobic-interaction chromatography	10.00	0.10	18,200.00	182,000.00	2,704.00	64.30
Reversed-phase chromatography						
Fraction A1A2-9	1.50	0.03	1,950.00	65,000.00	970.00	7.00
Fraction A1A2-14	2.10	0.05	2,945.00	58,900.00	875.00	10.40
<i>P. damnosus</i> CECT4797						
Culture supernatant	1,000.00	30,300.00	NID	NID	NE	NE
Ammonium sulfate precipitation	100.00	980.00	NID	NID	NE	NE
Gel filtration chromatography	140.00	420.00	8,120.00	19.30	1.00	100.00
Cation-exchange chromatography	50.00	2.50	4,750.00	1,900.00	98.50	58.50
Hydrophobic-interaction chromatography	10.00	0.10	42,230.00	422,300.00	21,881.00	520.00
Reversed-phase chromatography						
Fraction A1A2-9	1.50	0.03	2,293.00	76,433.00	3,960.00	28.20
Fraction A1A2-14	2.10	0.05	50,706.00	1,014,120.00	52,545.00	624.50

^aAbsorbance at 254 nm (A₂₅₄) multiplied by the volume in milliliters; ^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml), as determined by an MPA, multiplied by the total volume in milliliters; ^cSpecific antimicrobial activity expressed as the total activity (BU) divided by the total A₂₅₄

^dSpecific antimicrobial activity of a fraction (BU/A₂₅₄) divided by the specific activity of the cation-exchange chromatography (BU/A₂₅₄); NID, no inhibition detected; NE, not evaluable.

A1A2-14 showed a recovery of 10.4 and 624.5% of the antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797 found in the gel filtration fraction, respectively, and an 875- and 52,545-fold increase in specific antimicrobial activity, respectively (Table V.5).

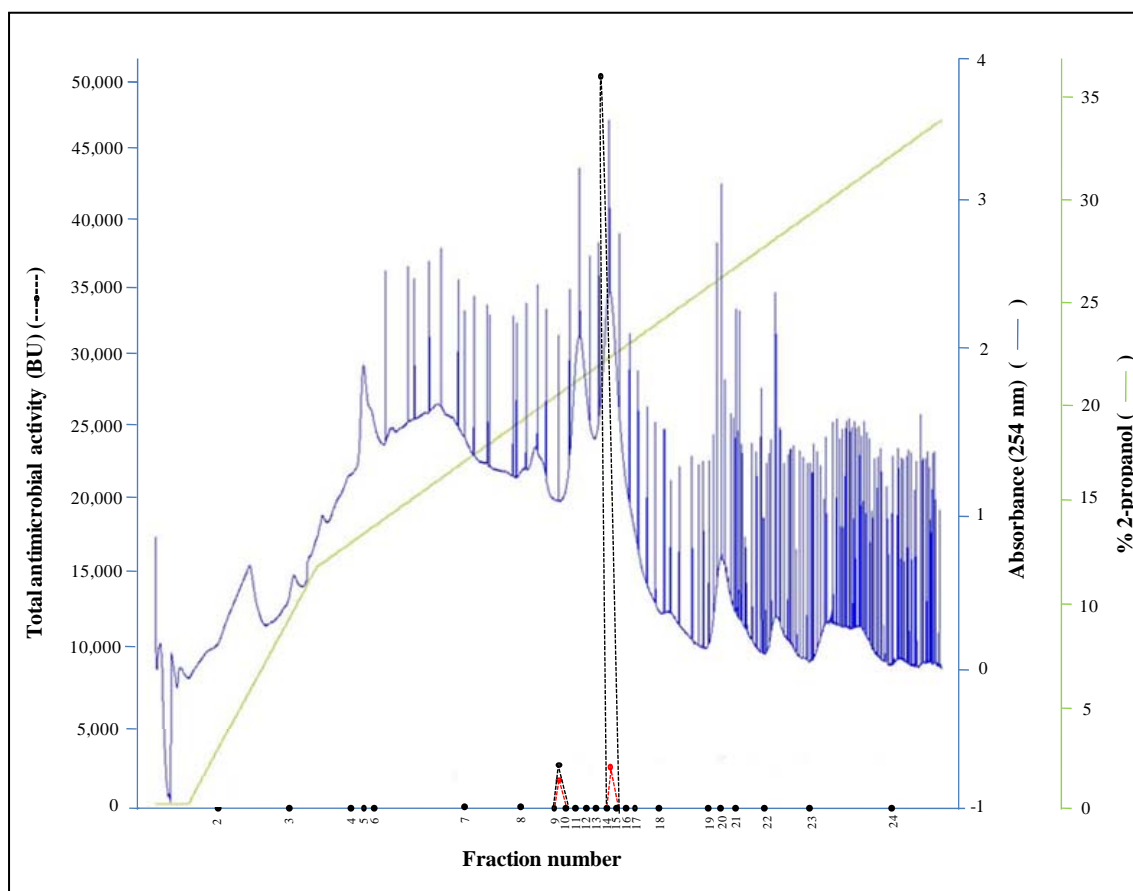


Figure 5.8. RP-FPLC chromatography of InfA₁ and InfA₂ secreted by *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂. The red and black dashed lines indicate the peaks showing bacteriocin activity against *S. pneumoniae* 66405 and *P. damnosus* CECT4797, respectively.

The results of MALDI-TOF analysis of all the fractions obtained from the last RP-FPLC run of each purification are shown in Figs. 5.9, 5.10, and 5.11. MALDI-TOF MS analysis of the two fractions (A1-15 and A1-17) purified from *L. lactis* NZ9000-IA₁ showed several peaks included in the molecular mass range of 900-4,000 Da, none of which had the predicted molecular mass of InfA₁ (3,357 Da) (Figs. 5.9A and 5.9B.). Similarly, a peak showing the predicted molecular mass of InfA₂ (3,000 Da) was not found in A2-13 and A2-14 (Figs. 5.10A and 5.10B). The results obtained from these fractions revealed several peaks whose molecular masses were included in the molecular mass range of 2,100-5,200 Da, while A2-14 also showed a major peak of 3,376 Da (Fig. 5.10B). Finally, analysis of the fractions obtained from *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂ (A1A2-9 and A1A2-14) also showed several peaks whose molecular masses

were included in the molecular mass range of 1,500-5,900 Da, none of which with the predicted molecular mass of InfA₁ or InfA₂ (Figs. 5.11A and 5.11B). The fraction termed A1A2-14 yielded a major peak of 3,024 Da (Fig. 5.11B).

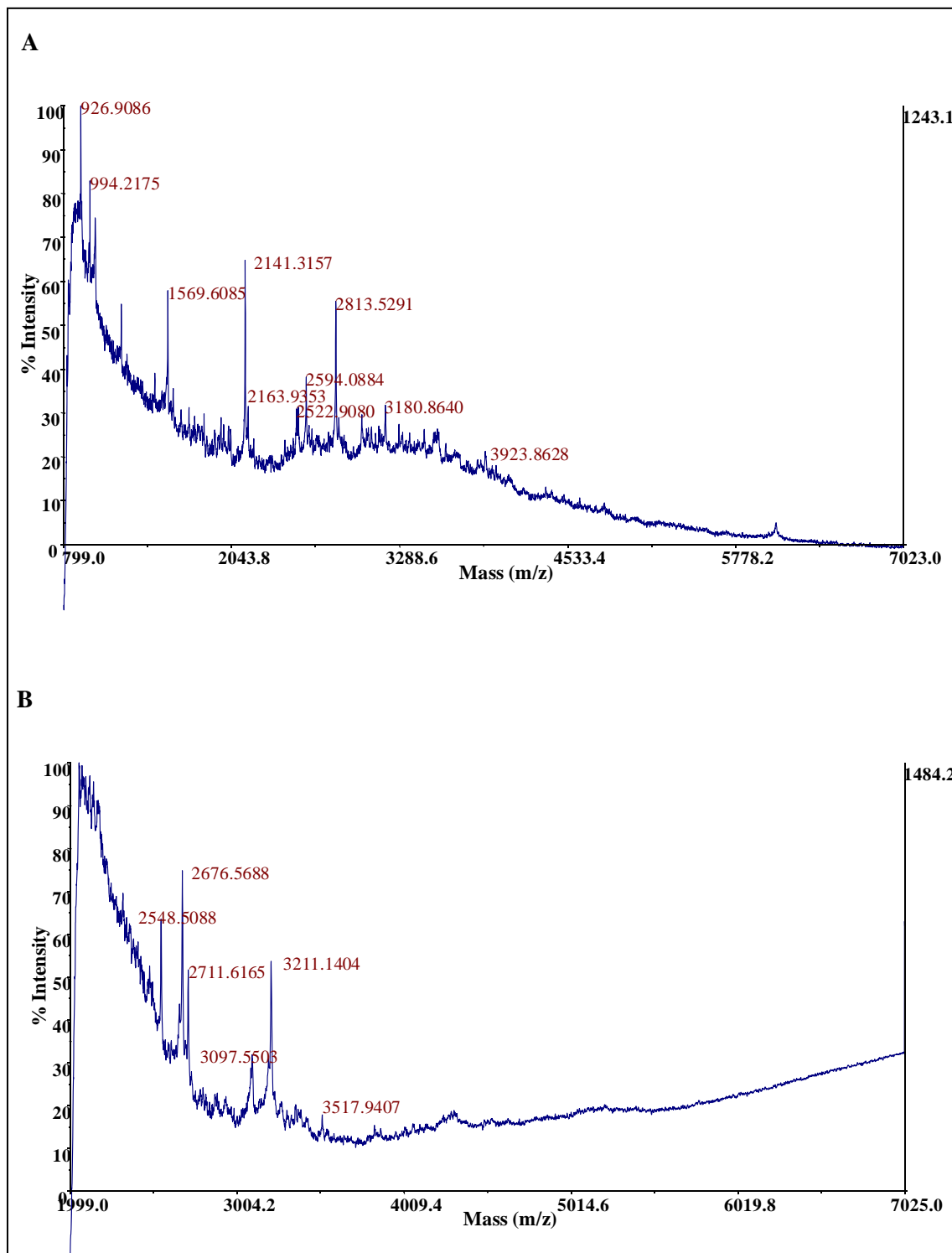


Figure 5.9. Mass spectrometry analysis of the purified antimicrobial peptides secreted by *L. lactis* NZ9000-IA₁. A: fraction A1-15; B: fraction A1-17.

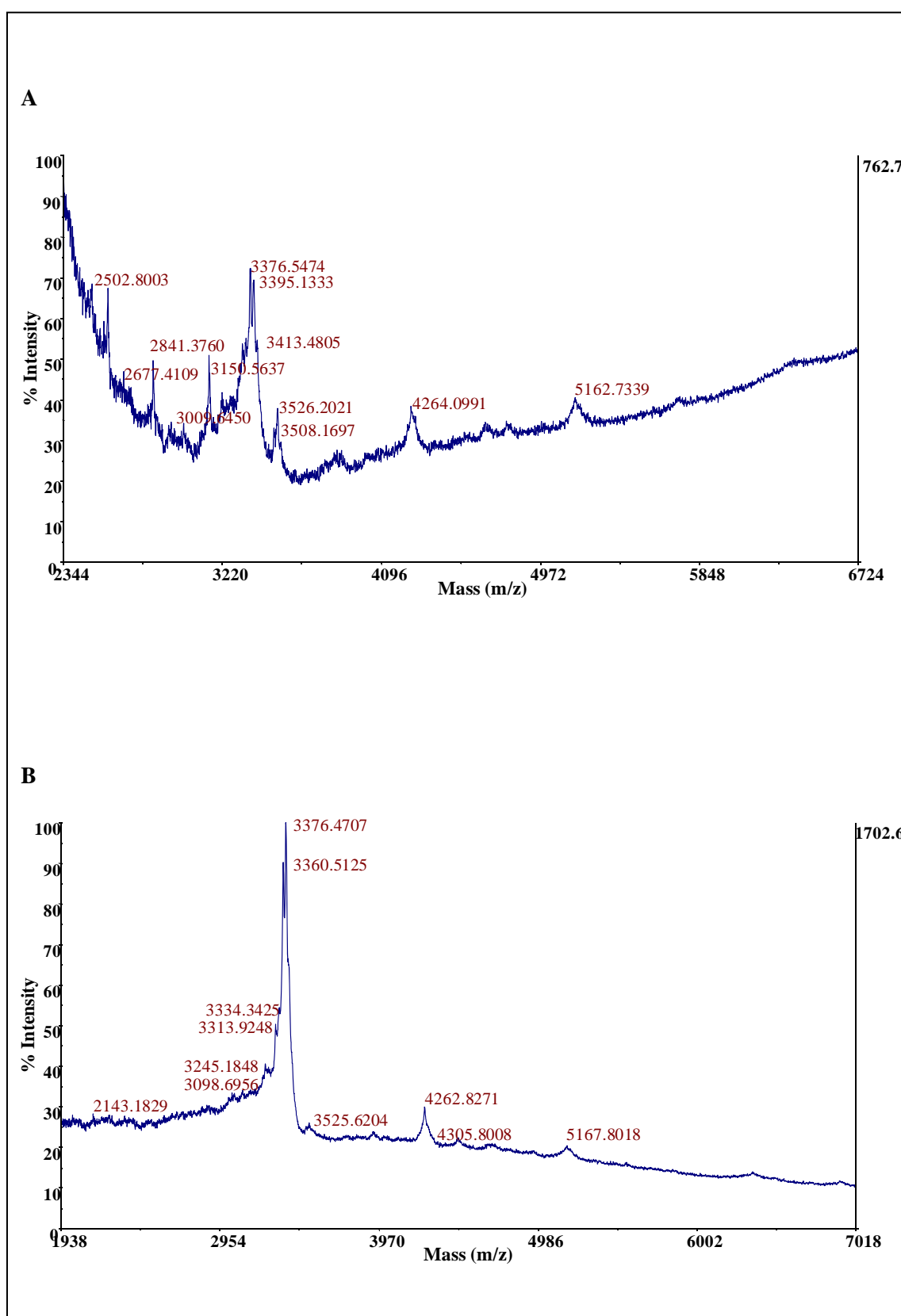


Figure 5.10. Mass spectrometry analysis of the purified antimicrobial peptides secreted by *L. lactis* NZ9000-IA₂. A: fraction A2-13; B: fraction A2-14.

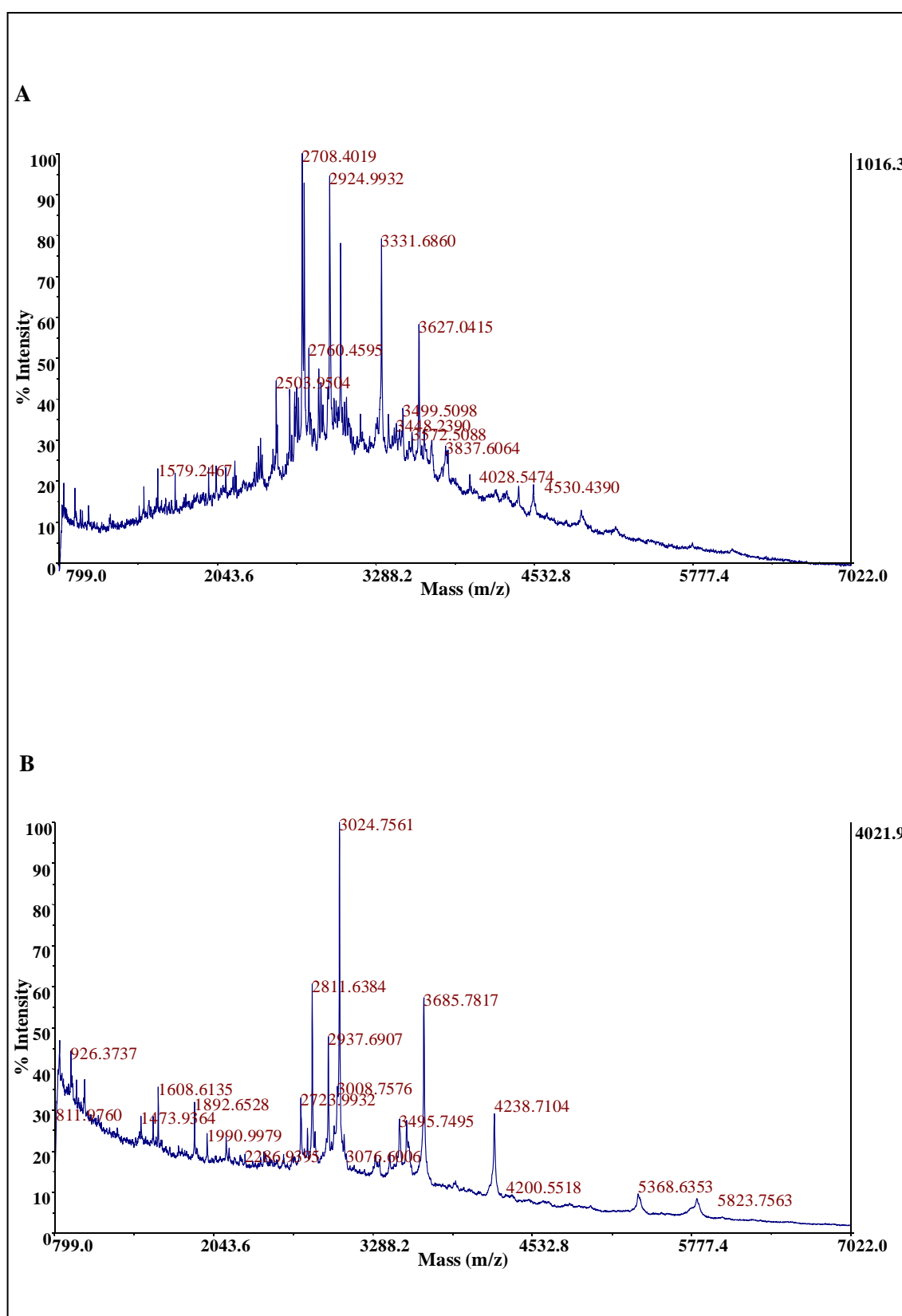


Figure 5.11. Mass spectrometry analysis of the purified antimicrobial peptides secreted by *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂. A: fraction A1A2-9. B: fraction A1A2-14.

VI.5. DISCUSSION

Increasing bacterial resistance to antibiotics worldwide underline the need for the development of new antimicrobials. In this context, bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria (LAB) have been proposed as an alternative to antibiotics in clinical settings (Cotter *et al.*, 2013). However, for the real widespread application of these peptides, large amount of them are required. Since purification of these antimicrobial peptides from the wild-type producer strains is usually expensive and results in low bacteriocin yields (Khan *et al.*, 2010), the researching of alternative systems for the production of higher levels of these antimicrobial peptides is necessary. In this context, herologous microbial systems, including LAB and yeasts, seem to offer a promising means (Lohans and Vederas, 2012).

The success of heterologous bacteriocin production seems to depend, at least, on the expression vector, signal peptide, and host strain used (Borrero *et al.*, 2011b). Yeasts have been largely used for the successful production of a variety of foreign peptides and proteins (Gellissen *et al.*, 2005; Böer *et al.*, 2007); however, their use as hosts for heterologous bacteriocin production has not been fully exploited yet (Borrero *et al.*, 2012). In this respect, *Pc. pastoris* has been used for the heterologous production of several bacteriocins, such as EntP from *E. faecium* P13 (Gutiérrez *et al.*, 2005), pediocin PA-1 (PedPA-1) from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 (Beaulieu *et al.*, 2005), HirJM79 from *E. hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2008), enterocin L50 [Ent50 (EntL50A and EntL50B)] from *E. faecium* L50 (Basanta *et al.*, 2010), and enterocin A (EntA) from *E. faecium* T136 (Borrero *et al.*, 2012). In all these cases, except for PedPA-1, biologically active bacteriocins were found in the CFSs of the recombinant *Pc. pastoris* strains. In this context, this work reports the heterologous production and secretion of the peptides InfA₁ and InfA₂ by *Pc. pastoris*. For this aim, the nucleotide regions of the structural bacteriocin genes *infA₁* and *infA₂* encoding the mature InfA₁ and InfA₂ peptides were cloned in the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZαA characterized by containing: (i) a strong and well regulated methanol-inducible promoter (PAOX1); (ii) the *Saccharomyces cerevisiae* gene region encoding the mating pheromone α-factor-1 secretion signal (MFα1s) including the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site (AAAAGA) required for processing of fusion proteins during MFα1s-directed secretion through the Sec-system, and (iii), a host homologous gene (AOX1) which drives the integration of the vector into the yeast genome, and thus maximize the stability of foreign protein production and allows the generation of multicopy strains (Cereghino and Cregg, 2000; Gutierrez *et al.*, 2005). Since no antimicrobial activity was exhibited by the recombinant yeast strains harboring the plasmids containing *infA₁* and *infA₂* when they were streaked onto BMMY agar, the recombinant strains *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂ were selected on the basis of their high Zeo resistance (3,000 and 2,000 µg/ml, respectively). It is known that yeast strains exhibiting high Zeo resistance are able to carry out the hyper-expression of recombinant proteins due to the integration of multiple copies of heterologous DNA in their genomes (Cereghino and Gregg,

2000; Apte-Deshpnade *et al.*, 2009; Basanta *et al.*, 2010). Subsequently, analysis of the CFSs of these recombinant yeasts grown in BMMY broth at 30 °C for 24, 48, 72 and 96 h after methanol induction by an ADT did not allow to detect antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 or *P. damnosus* CECT4797. In a further attempt to ascertain antimicrobial activity in the recombinant yeasts, their CFSs were subjected to partial protein purification, resulting in the detection of antimicrobial activity as the purification procedure progressed. The antimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 was first detected after the hydrophobic interaction step, and in both *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂ the maximum values were observed 72 h after induction of gene expression. The detection of the maximum antimicrobial activity after a relatively long growth period has also been described for a recombinant *Sc. cerevisiae* strain producing EntL50 (EntL50A and EntL50B) (Basanta *et al.*, 2009). On the other hand, no antimicrobial activity against *S. pneumoniae* was detected in any of the fractions at any of the times assayed. In this respect, it should be noted that, as described in Chapter IV, InfA₁ and InfA₂ could constitute a two-peptide bacteriocin system which requires the presence of both peptides combined to be active against *S. pneumoniae*. According to this, when the fractions obtained from *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂ hydrophobic interaction chromatographies were mixed in 1:1 ratio, antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 was observed. This result proves the production of InfA₁ and InfA₂ by *Pc. pastoris* X-33-A₁ and *Pc. pastoris* X-33-A₂, respectively, and further confirms that these peptides act as a two-peptide anti-pneumococcal bacteriocin.

On the other hand, LAB also constitute an interesting alternative as microbial cell factories. Because of their GRAS (Generally Recognized As Safe) or QPS (Qualified Presumption of Safety) status, LAB can be considered adequate hosts for the production and/or delivery of bacteriocins of biotechnological interest. This can be achieved by the: (i) expression of native biosynthetic genes, (ii) exchange or replacement of leader peptides and/or dedicated processing and secretion systems (ABC transporters), or (iii), fusion of mature bacteriocins to signal peptides that act as secretion signals (Gutiérrez *et al.*, 2006). LAB are Gram-positive microorganisms whose secretory proteins are externalized into the medium either by the Sec-system or by dedicated transported systems, thus facilitating and reducing the cost of protein purification (Gómez-Sala, 2013). At this respect, some LAB species such as *L. lactis* are an attractive option for heterologous protein secretion due to the fact that this microorganism has an established safety profile through its long use in fermented products and is considerate as a GRAS/QPS microorganism; moreover, *L. lactis* produces few secretory proteins which potentially could difficult the purification of the protein of interest (Bahey-El-Din *et al.*, 2010). In this context, previous studies have shown the successful use of *L. lactis* as an heterologous host to produce and secrete mature bacteriocins driven by heterologous signal peptides (Herranz and Driessen, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007a, 2007b; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b; Gómez-Sala, 2013). In this work, to evaluate the heterologous production of InfA₁ and InfA₂ by *L. lactis*, firstly, chimeric genes in which the nucleotide sequences encoding the leader

sequence of these bacteriocins were replaced by that of the signal peptide of Usp45 (SP_{Usp45}), a Sec-dependent protein produced by *L. lactis*, were constructed. Subsequently, since it is known that bacteriocin producers are protected from their own bacteriocins by the concomitant expression of a cognate immunity protein (Diep *et al.*, 2007; Kjos *et al.*, 2010), the three infantaricins putative immunity proteins, located downstream of the bacteriocin structural genes in *S. infantarius* LP90 genome (Chapter IV), were cloned in pMG36c, resulting in pMI. Finally, the InfA₁ and InfA₂ chimeric genes were cloned, separately and together, in pMI, and the resulting recombinant plasmids (pMIA₁, pMIA₂ and pMIA_{1A2}) were transformed into *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000. The results of MALDI-TOF MS analysis of the peptides purified from these three recombinant lactococcal strains by a multichromatographic procedure revealed that none of the fractions obtained after the last purification round had a molecular mass matching the predicted molecular masses of InfA₁ and InfA₂ (3,357 Da and 3,000 Da, respectively). The fraction (A1-17) obtained from *L. lactis* NZ9000-IA₁ contained a peak with a molecular mass of 3,211 Da, a value which is 146 Da lower than the predicted molecular mass of InfA₁. On the other hand, both fractions (A2-13 and A2-14) obtained from *L. lactis* NZ9000-IA₂ showed a major peak with a molecular mass 376 Da higher than the predicted molecular mass of InfA₂. Finally, the fractions obtained from *L. lactis* NZ9000-IA_{1A2} also resulted in a high number of peaks, of which the most prominent ones were those of 2,708 and 2,924 Da (A1A2-9) and of 3,024 Da (A1A2-14). These molecular masses do not match either the predicted molecular masses of InfA₁ or InfA₂. Nevertheless, InfA₁ and InfA₂ produced by *L. lactis* NZ9000-IA₁ and *L. lactis* NZ9000-IA₂, respectively, inhibited *S. pneumoniae* 66405 when tested in a 1:1 ratio. Likewise, the purified fractions obtained from *L. lactis* NZ9000-IA_{1A2}, which hypothetically produces both peptides at equimolar amounts, also showed antimicrobial activity against this indicator. Therefore, both peptides seem to be present in the corresponding fractions although, as suggested from their different molecular masses, in a modified form which would nevertheless allow them to exert anti-pneumococcal activity. This modification could be due to improper processing of the bacteriocin precursors, resulting in peptides with higher or lower than expected molecular mass. In this context, it is known that several factors, such as overall charge balance, hydrophobicity profile, and the interactions amongst the N-, H-, and C-regions of the signal peptide can influence the processing and secretion (Ng and Sarkar, 2013). On the other hand, peptides showing a molecular mass higher than the predicted one could be bonded with an unknown molecule from in the medium. Recombinant hosts should be capable of improving the production and increasing the specific antimicrobial activity as compared to that of the wild-type producer. In this respect, the increase of the specific anti-pneumococcal activity displayed by the fractions A1A2-9 and A1A2-14 purified from *L. lactis* NZ9000-IA_{1A2} was 970- and 875-fold, respectively. In contrast, the RP-FPLC fraction obtained from the purification of peptides produced by the wild-type producer *S. infantarius* LP90 resulted in an increase in the specific antimicrobial activity 20-fold higher than that obtained from this recombinant lactococcal strain (Chapter III). Therefore, although the fractions A1A2-9 and

A1A2-14 displayed anti-pneumococcal activity, several factors should be optimized for achieving an efficient heterologous production.

Summarizing, the present work describes the heterologous production of InfA₁ and InfA₂ by recombinant *Pc. pastoris* and *L. lactis* strains using genetic chimeras encoding yeast and lactococcal SPs, respectively, fused to the mature bacteriocin peptides. Our results demonstrate the successful production of InfA₁ and InfA₂ by both heterologous hosts and confirm that both peptides constitute a two-peptide bacteriocin system according to the anti-pneumococcal activity exhibited by the corresponding fractions mixed in a 1:1 ratio, as well as to the antimicrobial activity displayed by the purified fractions obtained from *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂, which hypothetically produces both peptides at equimolar amounts. However, further efforts should be done to elucidate the critical factors involved in the correct expression, processing and secretion of both peptides by *L. lactis* due to the fact that none of the recombinant purified peptides showed the predicted size of InfA₁ and InfA₂, as well as to the lower efficiency of this system as compared to that of the wild-type producer.

V.6. REFERENCES

- Apte-Deshpnade, A., G. Mandal, S. Soorapaneni, B. Prasad, J. Kumar, and S. Padmanabhan.** 2009. High-level expression of non-glycosylated and active staphylokinase from *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, 31:811-817.
- Bahey-El-Din, M., C. G. M. Gahan, and B. T. Griffin.** 2010. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Curr. Gene Ther.*, 10: 34-45.
- Basanta, A., C. Herranz, J. Gutiérrez, R. Criado, P. E. Hernández, and L. M. Cintas.** 2009. Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leader-less enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 2382-2392.
- Basanta, A., B. Gómez-Sala, J. Sánchez, D. B. Diep, C. Herranz, P. E. Hernández, and L. M. Cintas.** 2010. Use of the *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leader-less two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 3314-3324.
- Beaulieu, L., D. Groleau, C. B. Miguez, J. F. Jetté, H. Aomari, and M. Subirade.** 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr. Purif.*, 43: 111-125.
- Böer, E., G. Steinborn, G. Kunze, and G. Gellissen.** 2007. Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77: 513-523.
- Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauer, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* spp. *lactis* IL1403. *Genome Res.*, 11: 731-753.
- Bolotin, A., S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2002. Studies of genomes of dairy bacteria *Lactococcus lactis*. *Sci. Aliment.*, 22: 45-53.

- Borrero, J., J. J. Jiménez, L. Gútiéz, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2011a. Use of the *usp45* lactococcal secretion signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89: 131-143.
- Borrero, J., J. J. Jiménez, L. Gútiéz, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2011b. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, 156: 76-86.
- Borrero, J., G. Kunze, J. J. Jiménez, E. Böer, L. Gútiéz, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2012. Cloning, production, and functional expression of the bacteriocin enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 5956-5961.
- Burgess, C., M. O'Connell-Motherway, W. Sybesma, J. Hugenholtz, and D. van Sinderen.** 2004. Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for *in situ* production of vitamin-enriched foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 5769-5777.
- Cereghino, G. P. and J. M. Cregg.** 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10: 422-427.
- Cereghino, G. P. and J. M. Cregg.** 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 45-66.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643-2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321-4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández, and P. E. Hernández.** 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.*, 15: 289-298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Havarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes.** 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806-6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.*, 7: 281-305.
- Citti, R.** 2005. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. Ph.D. Thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 777-788.
- Cotter, P. D., R. P. Ross, and C. Hill.** 2013. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.*, 11: 95-105.
- Cregg, J. M., J. F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegel, M. Akong, W. S. Craig, R. G. Buckholz, K. R. Madden, P. A. Kellaris, G. R. Davis, B. L. Smiley, J. Cruze, R. Torregrossa, G. Veliclebi, and G. P.**

- Thill.** 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis-B surface-antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.*, 5: 479-85.
- Criado, R., D. B. Diep, Å. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández, and L. M. Cintas.** 2006. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 6653-6666.
- Diep, D. B. and I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets*, 3: 107-122.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo, and I. F. Nes.** 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104: 2384-2389.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen, and H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 564-582.
- Driessen, A. J. M. and N. Nouwen.** 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, 77: 643-667.
- Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo, and I. F. Nes.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria, an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 639-654.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 293-310.
- Gajic, O., G. Buist, M. Kojic, L. Topisirovic, O. P. Kuipers, and J. Kok.** 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.*, 278: 34291-34298.
- Garneau, S., N. I. Martin, and J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.*, 84: 577-592.
- Gellissen, G. and C. P. Hollenberg.** 1997. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*-a review. *Gene*, 190: 87-97.
- Gellissen, G., G. Kunze, C. Gaillardin, J. M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis, and I. van der Klei.** 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*. A comparison. *FEMS Yeast Res.*, 5: 1079-1096.
- Gillor, O. and L. Ghazaryan.** 2007. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 2: 115-122.
- Gillor, O. L., M. Nigro, and M. A. Riley.** 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potentials as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.*, 11: 1067-1075.
- Gómez-Sala, B.** 2013. Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino: caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de *Lactobacillus curvatus* BCS35. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Spain.

- Gutiérrez, J., R. Criado, M. Martín, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2005. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 3004-3008.
- Gutiérrez, J., R. Larsen, L. M. Cintas, J. Kok, and P. E. Hernández.** 2006. High-level heterologous production and functional expression of the Sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13, in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72: 41-51.
- Havarstein L. S., D. B. Diep, and I. F. Nes.** 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carries out proteolytic processing of their substrates concomitantly with export. *Mol. Microbiol.*, 16: 229-240.
- Herranz, C. and A. J. M. Driessen.** 2005. Sec-mediated secretion of enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1959-1963.
- Holo, H. and I. F. Nes.** 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 3119-3123.
- Holo, H., Ø. Nilssen, and I. F. Nes.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, 173: 3879-3887.
- Idiris, A., H. Tohda, H. Kumagai, and K. Takegawa.** 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86: 403-417.
- Khan, H., S. Flint, and P. L. Yu.** 2010. Enterocins in food preservation. *Int. J. Food. Microbiol.*, 141: 1-10.
- Kjos, M., Z. Salehian, I. F. Nes, and D. B. Diep.** 2010. An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J. Bacteriol.*, 192: 5906-5913.
- Kjos, M., J. Borrero, M. Opsata, D. J. Birri, H. Holo, L. M. Cintas, L. Snipen, P. E. Hernández, I. F. Nes, and D. B. Diep.** 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 157: 3256-3267.
- Kleerebezem, M., M. M. Beerthuyzen, E. E. Vaughan, W. M. de Vos, and O. P. Kuipers.** 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4581-4584.
- Kuipers, O. P., P. G. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.*, 15: 135-140.
- Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 1998. Quorum-sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, 64: 15-21.
- Kunji, E. R. S., D. J. Slotboom, and B. Poolman.** 2003. *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1610: 97-108.
- Lohans, C. T. and J. C. Vederas.** 2012. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int. J. Microbiol.*, 2012: 386410.
- Makrides, S. C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 60: 512-38.

- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2007a. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76: 667-675.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2007b. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food Prot.*, 70: 2792-2798.
- Mierau, I., P. Leji, I. van Swam, B. Blommestein, E. Floris, J. Mond, and E. J. Smid.** 2005a. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin. *Microb. Cell Fact.*, 4: 15.
- Mierau, I., K. Olieman, J. Mond, and E. J. Smid.** 2005b. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb. Cell Fact.*, 4: 16.
- Natale, P., T. Brüsser, and A. J. Driessen.** 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane: distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778: 1735-1756.
- Nes, I. F. and H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55: 50-61.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 113-128.
- Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189: 1189-1198.
- Ng, D. T. and C. A. Sarkar.** 2013. Engineering signal peptides for enhanced protein secretion from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 347-356.
- Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang, and H. Y. Kim.** 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 1171-1185.
- Rigoulay, C., I. Poquet, S. M. Madsen, and A. Gruss.** 2004. Expression of the *Staphylococcus aureus* surface proteins HtrA1 and HtrA2 in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 237: 279-288.
- Riley, M. A. and J. E. Wertz.** 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Ann. Rev. Microbiol.*, 56: 117-137.
- Sánchez, J., D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2007. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.*, 270: 227-236.
- Sánchez, J., J. Borrero, B. Gómez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2008. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 8: 2471-2479.
- Schoeman, H., M. A. Vivier, M. Du Toit, L. M. Dicks, and I. S. Pretorius.** 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15: 647-656.

- Shin, M. K. and H. S. Yoo.** 2013. Animal vaccines based on orally presented yeast recombinants. *Vaccine*, 31: 4287-4292.
- Skaugen, M., L. M. Cintas, and I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225-260. Wood, B. J. B. and P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Van Asseldonk, M., W. M. de Vos, and G. Simons.** 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* Usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous α -amylase. *Mol. Gen. Genet.*, 240: 428-434.
- Van de Guchte, M., J. M. van der Vossen, J. Kok, and G. Venema.** 1989. Construction of a lactococcal expression vector expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 224-228.
- Walker, E. S. and F. Levy.** 2001. Genetic trends in a population evolving antibiotic resistance. *Evolution*, 55: 1110-1122.
- Wegmann, U., M. O'Connell-Motherway, A. Zomer, G. Buist, C. Shearman, C. Canchaya, M. Ventura, A. Goesmann, M. J. Gasson, O. P. Kuipers, D. van Sinderen, and J. Kok.** 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.*, 189: 3256-3270.

CAPÍTULO VI

Actividad antimicrobiana de la infantaricina A
(infantaricinas A₁ y A₂) de *Streptococcus infantarius*
LP90 frente a *Streptococcus pneumoniae* en caldo
de cultivo, saliva humana y un sistema modelo
de *biofilm*

CHAPTER VI

*Antimicrobial activity of infantaricin A (infantaricins A₁
and A₂) of Streptococcus infantarius LP90 against
Streptococcus pneumoniae in broth, human saliva and a
biofilm model system*

VI.1. ABSTRACT

The multibacteriocinogenic strain *Streptococcus infantarius* LP90, isolated from water-buffalo milk, displays a broad and strong antimicrobial spectrum against clinical strains of *Streptococcus pneumoniae in vitro* due, at least, to the modified infantaricin A₁ (InfA₁) (3,963Da) (Chapters III and IV). Moreover, the anti-pneumococcal activity exerted by the recombinant InfA₁ and infantaricin A₂ (InfA₂) produced by *Pichia pastoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and combined in a 1:1 ratio, confirmed that both peptide constitute a two-peptide bacteriocin system termed infantaricin A (InfA) (Chapter V). Nevertheless, due to the complexity of peptide purification and the low efficiency of these heterologous production systems, chemical synthesis of both peptides was performed in order to evaluate its potential use as an alternative or complement to the traditional antibiotic therapy. In this respect, the main goals of this work were the evaluation of the antimicrobial activity and the mechanism of action of InfA (InfA₁ and InfA₂) against *S. pneumoniae* in broth, human saliva and a biofilm model system. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of InfA₁ purified from *S. infantarius* LP90 (InfA_{1-P}) and of the chemically-synthesized InfA₁ and InfA₂ peptides (InfA_{1-S} and InfA_{2-S}), assayed independently and combined at different ratios (2:1, 1:1 and 1:2) against *S. pneumoniae* grown in BHI broth showed that only the combined use of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} (2:1, 1:1 and 1:2 ratios), but none of the peptides alone, exerted anti-pneumococcal activity, confirming that InfA₁ and InfA₂ constitute a two-peptide bacteriocin system. The lowest MIC value (0.937 µM), which was 3.3-fold lower than that of InfA_{1-P}, was obtained when InfA_{1-S} and InfA_{2-S} were used at 2:1 and 1:1 ratios. Time-killing kinetic studies of *S. pneumoniae* in broth revealed that the combined use of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} at a 1:1 ratio (0.937 µM, 1× MIC), but not the independent peptides, exerted a bactericidal effect characterized by a rapid decline (> 5 log) in pneumococcal counts from the first hour after bacteriocin addition, with no viable counts detected for the subsequent 8 h. The results obtained using *S. pneumoniae* biofilms as the target of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) at concentrations ranging from 50 to 0.2 µM (53-0.2× MIC) showed that the bacteriocin was also active, but less than in planktonic cells. On the other hand, evaluation of the stability of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) in human saliva at 37 °C showed that it retained 90% of its original anti-pneumococcal activity after 8 h. Time-killing kinetic studies of *S. pneumoniae* in human saliva revealed that InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) (7.5 µM) also exhibits a bactericidal anti-pneumococcal activity in this biological fluid, which is characterized by a rapid decline (> 5 log) in pneumococcal counts at the first hour of treatment. Finally, evaluation of the impact of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) (50 µM) on saliva microbiota revealed that this bacteriocin caused a rapid reduction in the total anaerobic counts of this biological fluid, including a marked decrease of streptococci. Taken together, our results reveal that InfA (InfA₁ and InfA₂) is a two-peptide bacteriocin which exerts bactericidal activity against *S. pneumoniae* in broth and human saliva, and is stable in this biological fluid. Moreover, this bacteriocin also inhibited the growth of *S. pneumoniae* in an *in vitro* biofilm model system. Although further studies are

required to determine whether the InfA (InfA₁ and InfA₂) antimicrobial activity observed *in vitro* can be translated into clinical practice, the results obtained in this work suggests that this bacteriocin might be orally administered as an alternative or complement to antibiotics to control pneumococcal infections.

VI.2. INTRODUCTION

Human nasopharyngeal microbiota may contain potential pathogens which are able to colonize the host without causing disease. This is certainly the case for *Streptococcus pneumoniae*, which is found in the nasopharynx of up to 60% of healthy preschool children (Henriques-Normark and Normark, 2010). However, *S. pneumoniae* is also an important etiological agent of acute bacterial sinusitis, meningitis and bacteremia, and represents the major cause of acute bacterial pneumonia and otitis media (OM). In this respect, next to the common cold, OM is the most frequent cause of childhood illness and entails a very high socioeconomic impact (Allegrucci *et al.*, 2006). Pneumococci infect the middle ear via the Eustachian tube from the nasopharynx (Faden *et al.*, 1997). In this respect, colonization of nasopharyngeal mucosa by *S. pneumoniae* may be an initial event in the progression to disease, being often a transient process. *S. pneumoniae* is equipped with several tools that facilitate its adaptation to and competition within this ecological niche, such as: (i) the ability to evade oxidation of the thiol groups in cysteine residues, which allows this pathogen to efficiently handle the oxidizing environment prevailing in the upper respiratory tract despite of being catalase negative (Daniels *et al.*, 2010); (ii) the production of peptidoglycan-modifying enzymes, which confer resistance to human lysozyme (Davis *et al.*, 2008); (iii) the production of high levels of hydrogen peroxide, which may affect the growth of more sensitive catalase negative organisms and therefore confer a competitive advantage (Regev-Yochay *et al.*, 2006), and (iv) the capacity to form biofilms (Henriques-Normark and Normark, 2010). Biofilms are microbial communities attached to a surface and encased within an extracellular matrix. Bacteria within biofilms are more resistant than planktonic cells to environmental stress factors, including antimicrobial agents and host defense mechanisms such as opsonization, lysis by complement and phagocytosis (Allegrucci *et al.*, 2006; Hall-Stoodley *et al.*, 2006; Blanchette-Cain *et al.*, 2013). Pneumococcal biofilms have been detected in human sinus mucosa biopsies, patients with tonsillitis and children with chronic OM. Biofilm formation by pneumococci during human nasopharyngeal colonization results in a weak inflammatory response which could contribute to the development of an asymptomatic process (Blanchette-Cain *et al.*, 2013). Although some results support the hypothesis that biofilms play a major etiologic role in OM and its frequent complications (Ehrlich *et al.*, 2002), recent findings suggest that the ability to form biofilms is not required for virulence, but instead contributes to long-term colonization and transmission of pneumococci (Sánchez *et al.*, 2011). OM is the main cause of antimicrobial prescription in developed countries. However, the fact that recurrent infections are frequently produced by the same strain, and not by a different infective agent as previously postulated, is an indication of

antibiotic therapy failure (McCullers *et al.*, 2007). In this context, antibiotics cause changes in the composition and abundance of commensal microbes, with the long-term effects of these changes remaining largely unknown. In children with recurrent OM, repeated courses of antibiotics favour the emergence of resistant phenotypes and, at the same time, may reduce populations of the beneficial bacteria acting as barriers to colonization and/or growth of potential pathogens (Brook and Gober, 2009). On the other hand, immunoprophylaxis seems the most efficient way to prevent infections caused by *S. pneumoniae*. However, since the nasopharyngeal microbiota is very dynamic, replacement of the serotypes included in the vaccines by non-vaccine serotypes occurs very commonly (Rodgers *et al.*, 2009; Schuerman *et al.*, 2009). Due to these limitations, bacteriocins, defined as ribosomally-synthesised antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria (LAB) and other bacteria, could be used in clinical settings as an alternative or complement to antibiotic treatment. Several studies have shown that microorganisms isolated from the nasopharynx, mainly α -haemolytic streptococci, are able to inhibit the growth of pathogens that commonly cause OM (Walls *et al.*, 2003), and this antimicrobial effect has been mainly attributed to bacteriocins (Walls *et al.*, 2003; Brook, 2005). Bacteriocins can be classified into three main classes: (i) the lantibiotics, or posttranslationally modified peptides; (ii) the nonmodified, small, heat-stable peptides; and (iii) the large, heat-labile protein bacteriocins. Class II bacteriocins are further grouped into five subclasses: the subclass IIa (pediocin-like bacteriocins containing the N-terminal conserved motif YGNGVxC), the subclass IIb (two-peptide bacteriocins), the subclass IIc (leaderless bacteriocins), the subclass IId (circular bacteriocins), and the subclass IIE (other peptide bacteriocins) (Nes *et al.*, 2007; Franz *et al.*, 2007).

Streptococcus infantarius LP90, a multibacteriocinogenic strain isolated from water-buffalo milk, displays a broad and strong antimicrobial spectrum against clinical strains of *Streptococcus pneumoniae in vitro* due, at least, to the modified infantaricin A₁ (InfA₁) (3,963Da) (Chapters III and IV). Moreover, the anti-pneumococcal activity exerted by the recombinant InfA₁ and infantaricin A₂ (InfA₂) produced by *Pichia pastoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and combined in a 1:1 ratio confirmed that both peptide constitute a two-peptide bacteriocin system termed infantaricin A (InfA) (Chapter V). However, due to the complexity of peptide purification and the low efficiency of these heterologous production systems, chemical synthesis of both peptides was performed in order to determine the potential use of this bacteriocin as an alternative or adjunct therapy in the treatment of pneumococcal infections. In this respect, the main goals of this work were the evaluation of the antimicrobial activity and the mechanism of action of InfA (InfA₁ and InfA₂) against *S. pneumoniae* in broth, human saliva and a biofilm model system.

VI.3. MATERIALS AND METHODS

VI.3.1. Bacterial strains and culture conditions

S. infantarius LP90 was grown aerobically in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 37 °C for 12 h. *S. pneumoniae* 66405, isolated from a human clinical sample, was provided by the Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal (Madrid, Spain). This strain was first inoculated on Columbia agar supplemented with horse blood (5%, w/v) (COH) (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) plates and incubated under aerobic conditions at 37 °C overnight. Subsequently, a loop of bacterial mass taken from the surface of these plates was transferred to Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid), and cultures were incubated under aerobic conditions at 37 °C for approximately 6 h (OD₆₀₀ of 0.5). Solid media used for bacterial counts contained 1.5% (w/v) agar (Oxoid).

VI.3.2. Purification of InfA₁ from *S. infantarius* LP90

InfA₁ was purified as described in Chapter III. For this purpose, a *S. infantarius* LP90 preculture obtained as described above was used to inoculate 1-liter of MRS broth, which was incubated at 37 °C under aerobic conditions for 12 h. After the cells were removed by centrifugation at 12,000 × *g* at 4 °C for 10 min, the proteins present in the cell-free supernatant (CFS) were subjected to precipitation with ammonium sulphate (50%, w/v) (Merck Farma y Química S. A., Barcelona, Spain). The solution was stirred at 4 °C for 3 h and then centrifuged (12,000 × *g* at 4 °C for 30 min). The pellet and floating materials were mixed and solubilized in 200 ml of 20 mM phosphate buffer (NaP) (pH 6.0), and subsequently desalted by gel filtration (PD-10 columns; GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). The resulting fractions were further subjected to cation-exchange (HiPrep 16/10 SP XL, GE Healthcare) and reverse-phase (PepRPC HR 5/5, GE Healthcare) chromatographies, both performed in a Fast Protein Liquid Chromatography system (ÄKTA-FPLC) (GE Healthcare). The antimicrobial activity of the fractions obtained during the purification procedure was determined by a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000) using *S. pneumoniae* 66405 as indicator microorganism. For this purpose, 50 µl of two-fold serial dilutions of samples and 150 µl of a diluted (approx. 4×10⁵ cfu/ml) fresh overnight culture of the indicator microorganism were added to each well of the microtiter plate. After incubation at 37 °C for 12-16 h, growth inhibition was measured spectrophotometrically at 620 nm in a microtiter plate reader (Labsystems iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finland). One bacteriocin unit (BU) was defined as the highest dilution of the supernatant causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin). The fraction from the last reverse-phase chromatography showing anti-pneumococcal activity was subjected to mass spectrometry (MS) analysis in a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) Voyager-DE STR mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Foster City, California, USA) at

the Mass Spectrum Service of Parque Científico-UCM (Madrid, Spain).

VI.3.3. Chemical synthesis of InfA₁ and InfA₂

Chemically-synthesized InfA₁ and InfA₂ peptides (InfA_{1-S} and InfA_{2-S}, respectively) were obtained by Microwave-assisted Solid Phase Peptide Synthesis (MW-SPPS) on a LibertyTM CEM microwave peptide synthesizer (CEM Corporation, Dublin, Ireland) using Fmoc-L-Cys(Trt)-HMBP-ChemMatrix[®] and H-Phe-HMPB-ChemMatrix[®] resins (Matrix Innovation, Quebec, Canada), respectively, at the MoorePark Research Center (Carlow, Ireland). Both synthetic peptides were then purified by RP-HPLC on a Vydac column (Vydac, California, USA) using 30-46% acetonitrile-0.1% (v/v) TFA and 15-35% acetonitrile-0.1% (v/v) TFA gradients for InfA_{1-S} and InfA_{2-S}, respectively, run over 40 min and with the eluent monitored at 214 nm. Fractions of the desired molecular mass were identified by MALDI-TOF MS and lyophilized on a Genevac HT 4X (Genevac Ltd. Ipswich, UK) lyophilizer.

VI.3.4. Anti-pneumococcal activity of InfA₁ purified from *S. infantarius* LP90 and the chemically-synthesized peptides InfA_{1-S} and InfA_{2-S}

The antimicrobial activity of InfA₁ purified from *S. infantarius* LP90 (InfA_{1-P}) and InfA_{1-S} and InfA_{2-S} was firstly detected by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.* 1995) using *S. pneumoniae* 66405 as indicator microorganism. Briefly, 40 ml of BHI soft agar (0.8%, w/v) were inoculated with approximately 1×10^5 cfu/ml of the indicator strain and poured onto a Petri dish. After cooling, wells (6-mm diameter) were made in the agar, and 50 µl of InfA_{1-P} and of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} assayed independently and combined at 2:1, 1:1 and 1:2 ratios were added. Then, the plates were incubated aerobically at 37 °C for 12-16 h. Finally, antimicrobial activity was quantified by measuring the diameter (mm) of the inhibition zones around the wells. The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of InfA_{1-P} and of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} assayed independently and combined at 2:1, 1:1 and 1:2 ratios against *S. pneumoniae* 66405 was determined by a microdilution assay (Cotter *et al.*, 2006). For this purpose, 0.2 ml of the indicator (final concentration of 1×10^5 cfu/ml) were placed in the wells of a microtitre plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). After adjusting the antimicrobial peptides to a starting concentration of 7.5 µM, two-fold serial dilutions of the peptide or peptide mixtures were added to the wells containing the indicator and the plates were incubated at 37 °C for 6-8 h. The MICs for *S. pneumoniae* 66405 were obtained from the lowest concentration of peptide or peptide mixture that caused growth inhibition.

VI.3.5. Mode of action of *S. infantarius* LP90 concentrated supernatants, InfA_{1-P} and the chemically-synthesized peptides InfA_{1-S} and InfA_{2-S} against *S. pneumoniae* in broth

CFSs were obtained from *S. infantarius* LP90 cultures grown as stated above. After adjusting their pH to 6.2, they were lyophilized, resuspended in 1/20 of their original volume

(20× concentrated supernatants, [20× CSs]) in 20 mM NaP (pH 6.0), filter-sterilized through 0.22 µm-pore-size filters (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA) and stored at -20 °C until further use. Fresh overday cultures of *S. pneumoniae* 66405 diluted in BHI broth to a final concentration of 1×10^5 cfu/ml were subjected to different treatments, including the addition of: (i) 500 µl of a 20×CS from *S. infantarius* LP90; (ii) 5 µM InfA_{1-P} (corresponding to 1× MIC); (iii) 0.937 µM of InfA_{1-S} or InfA_{2-S}, and (iii) 0.937 µM of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} combined in a 1:1 ratio (corresponding to 1× MIC). *S. pneumoniae* 66405 cultures without any addition or with the addition of 500 µl of 20-fold concentrated (by lyophilization) MRS broth were used as controls. After incubation at 37 °C for 0, 1, 2, 4, and 8 h, viable *S. pneumoniae* cells were determined in duplicate by plating ten-fold serial dilutions onto BHI agar and incubating the plates under aerobic conditions at 37 °C overnight.

VI.3.6. Effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on *S. pneumoniae* biofilms

The effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on *S. pneumoniae* biofilm formation was determined using the model described previously by García-Castillo *et al.* (2011). For this purpose, nitrocellulose filter disks (Millipore Corp.) placed on COH plates were co-inoculated with 100 µl of an overday culture of *S. pneumoniae* 66405 (1×10^5 cfu/ml) and 100 µl of two-fold serial dilutions (ranging from 50 to 0.2 µM, corresponding to 53 to 0.2× MIC) of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} combined in a 1:1 ratio. A nitrocellulose filter disk inoculated with 100 µl of an overday culture of *S. pneumoniae* 66405 was used as positive control for biofilm formation. After incubation under anaerobic conditions at 37 °C for 24 h, the biofilms grown on the filter surfaces were resuspended in sterile saline solution (0.9% [w/v] NaCl), and bacterial enumeration was performed as described above. The production of α-hemolysin activity was detected by the presence of dark and greenish zones on the COH plates.

Similarly, to determine the effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on 24-h biofilms developed as described above but in the absence of the bacteriocin, 100 µl of two-fold serial dilutions (ranging from 50 to 0.2 µM) of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} combined in a 1:1 ratio were added over the *S. pneumoniae* preformed biofilm, and plates were incubated as described above for 2 h. After incubation, biofilms were resuspended and bacteria were enumerated as described above.

VI.3.7. Stability of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) in human saliva

To evaluate the stability of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) in human saliva, a sample of this fluid was subjected to low speed centrifugation ($1,000 \times g$) at 4 °C for 10 min to remove eukaryotic cells and large debris, and then filter-sterilized through 0.22 µm-pore-size filters (Millipore Corp.). Then, it was incubated under aerobic conditions at 37 °C for 10 and 30 min, and 1, 4 and 8 h in the presence of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} (1:1 ratio) at a final concentration of

50 μ M (53 \times MIC). Finally, the residual anti-pneumococcal activity of the bacteriocin was determined by a MPA.

VI.3.8. Mode of action of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) against *S. pneumoniae* in human saliva

For the determination of the anti-pneumococcal effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) in human saliva, a fresh overday culture of *S. pneumoniae* 66405 was diluted in this biological fluid to a final concentration of 1×10^5 cfu/ml. Subsequently, InfA_{1-S} and InfA_{2-S} (1:1 ratio) were added at a final concentration of 0.937, 1.9, 3.75 and 7.5 μ M. The negative control consisted of a *S. pneumoniae* 66405 culture in saliva. After incubation under aerobic conditions at 37 °C for 0, 1, 2, 4, and 8 h, viable bacteria were determined in duplicate by plating onto BHI agar as described above.

VI.3.9. Effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on saliva microbiota

To evaluate the effect of InfA_S on saliva bacterial population, InfA_{1-S} and InfA_{2-S} combined at a 1:1 ratio were added at 50 μ M (53 \times MIC) to human saliva prepared as described above. The samples were mixed by shaking and incubated under aerobic conditions at 37 °C for 0, 10 and 30 min, and 1 h. Untreated saliva incubated under the same conditions was used as control. For determination of viable bacteria, ten-fold serial dilutions of the samples were spread-plated onto COH plates which were incubated under anaerobic conditions (Anaerogen system, Oxoid) at 37 °C for 48 h. Subsequently, taxonomical identification of the viable bacterial population was performed by polymerase chain reaction (PCR) amplification and nucleotide sequencing of an internal fragment of the *sodA* gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase (Poyart *et al.*, 1998). For this purpose, total DNA from ten colonies randomly collected from each sample was extracted with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI). PCR amplifications were carried out in 50 μ l reaction mixtures containing 300-500 ng of DNA, 70 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), and 1U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California). Oligonucleotide primers used in this study, *d1* (5'-CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC-3') and *d2* (5'-ARTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC-3'), were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, United Kingdom). Reactions without template DNA were set up as negative controls. PCR mixtures were subjected to thermal cycling under the following conditions: initial denaturation (97 °C for 3 min) followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 30 sec), annealing (50 °C for 2 min), elongation (72 °C for 1 min 30 sec) and a final 12-min extension at 72 °C, in an Eppendorf Mastercycler DNA thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplified PCR products were resolved by electrophoresis through agarose (2%, w/v) (Pronadisa, Madrid, Spain) gels stained with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA), and analyzed with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). The molecular size marker used was HyperLadder II (Bioline

London, United Kingdom). The PCR products were purified using the NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Service of Parque Científico-UCM (Madrid, Spain). The nucleotide BLAST software (NCBI [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome]) was used for performing nucleotide similarity searches. The percentage of identity to ascribe isolates to a particular species was set at $\geq 97\%$.

VI.4. RESULTS

VI.4.1. Comparative anti-pneumococcal activity of InfA_{1-P} and the chemically-synthesized peptides InfA_{1-S} and InfA_{2-S}

The anti-pneumococcal activity of InfA_{1-P} was compared with that of InfA_{1-S} and InfA_{2-S}, tested both independently and combined at 2:1, 1:1 and 1:2 ratios, by an ADT. The results obtained (Fig. 6.1) showed that: (i) only the combination of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} (2:1, 1:1 and 1:2 ratios), but not the individual peptides, exerted anti-pneumococcal activity; (ii) InfA_{1-S} and InfA_{2-S} combined at a 1:2 ratio displayed lower anti-pneumococcal activity than InfA_{1-S} and InfA_{2-S} combined at 2:1 and 1:1 ratios, and (iii) the combined use of InfA_{1-S} and InfA_{2-S} exerted a higher anti-pneumococcal activity than InfA_{1-P}.

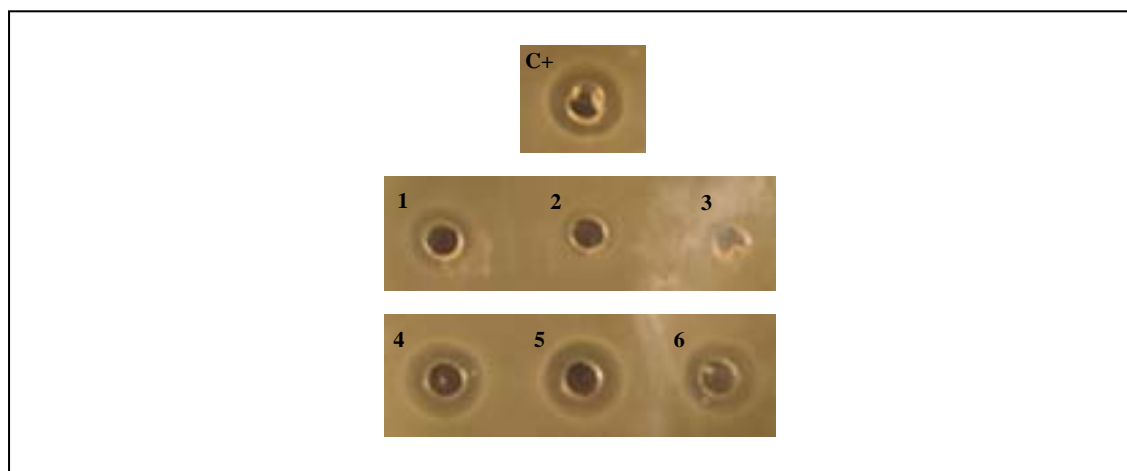


Figure 6.1. Antimicrobial activity of InfA_{1-P} and InfA_{1-S} and InfA_{2-S} tested independently and combined at different ratios against *S. pneumoniae* 66405, as determined by an ADT. InfA_{1-P} (1), InfA_{1-S} (2), InfA_{2-S} (3), InfA_{1-S} and InfA_{2-S} at 2:1, 1:1 and 1:2 ratios (4), (5) and (6), respectively; C+: CFS from an *S. infantarius* LP90 culture used as positive control.

These results match those of the MICs of InfA_{1-P}, and InfA_{1-S} and InfA_{2-S}, assayed both independently and combined at different ratios, by the broth microdilution method against *S. pneumoniae* 66405 (Table VI.1), which showed that: (i) InfA_{1-S} and InfA_{2-S} only displayed anti-pneumococcal activity when they were combined (2:1, 1:1 and 1:2 ratios); (ii) the MICs

obtained at 2:1 and 1:1 ratios (5.9 mg/ml) were 2-fold lower than that obtained at a 1:2 ratio (11.9 mg/ml), and (iii), combination of the peptides at 2:1 and 1:1, and 1:2 ratios have a MIC value 3.3- and 1.6-fold lower, respectively, than that of InfA_{1-P} (19.8 mg/ml).

Table VI.1. MICs of InfA_{1-P} and chemically synthesized InfA_{1-S} and InfA_{2-S} tested independently and combined at different bacteriocin ratios

InfA _{1-P}		InfA _{1-S}		InfA _{2-S}		InfA _{1-S} -InfA _{2-S} 2:1		InfA _{1-S} -InfA _{2-S} 1:1		InfA _{1-S} -InfA _{2-S} 1:2	
nM	mg/ml	nM	mg/ml	nM	mg/ml	nM	mg/ml	nM	mg/ml	nM	mg/ml
5000	19.8	NA	NA	NA	NA	937.5	5.9	937.5	5.9	1875	11.9

Antimicrobial activity as determined by a microdilution assay against *S. pneumoniae* 66405. Results are means of duplicate experiments; NA: no activity.

VI.4.2. Mode of action of *S. infantarius* LP90 concentrated supernatants, InfA_{1-P} and the chemically-synthesized peptides InfA_{1-S} and InfA_{2-S} against *S. pneumoniae* in broth

In order to determine the mode of action of the antimicrobial peptides produced by *S. infantarius* LP90, a fresh culture of *S. pneumoniae* 66405 diluted in BHI broth at a final concentration of 1×10^5 cfu/ml was treated with 20×CS, InfA_{1-P} and InfA_{1-S} and InfA_{2-S} independently and combined at a 1:1 ratio. As shown in Fig. 6.2, the exposure of *S. pneumoniae* 66405 to the 20×CS resulted in a bactericidal effect characterized by a rapid reduction in the pneumococcal counts (3 log) in the first hour after treatment, with no viable cells being detected from the second hour until the end of the experiment (8h). This effect was not seen on the *S. pneumoniae* 66405 cultures treated with 20-fold concentrated MRS, which attained a final growth similar to the untreated control.

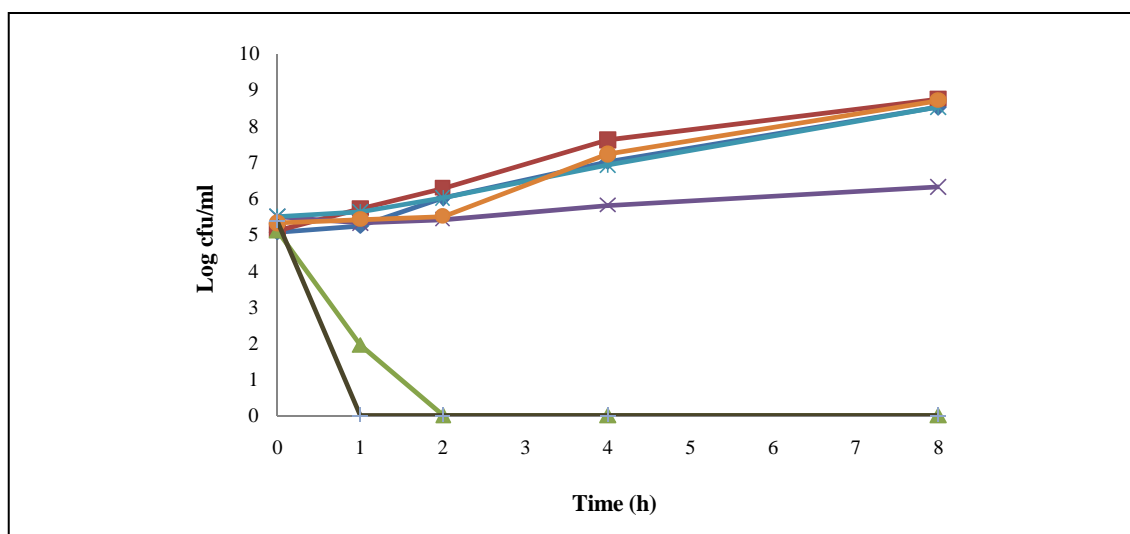


Figure 6.2. Mode of action of the antimicrobial peptides of *S. infantarius* LP90 against *S. pneumoniae* 66405 in broth. ■, untreated culture; ◆, concentrated MRS broth; ▲, 20×CS; ×, InfA_{1-P} (5 μM); *, InfA_{1-S} (0.937 μM); ○, InfA_{2-S} (0.937 μM); +, InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) (0.937 μM).

On the other hand, the evaluation of the effect of InfA_{1-P} (5 μ M, 1 \times MIC), and InfA_{1-S} and InfA_{2-S} tested independently (0.937 μ M) and in combination (0.937 μ M, 1:1 ratio) (1 \times MIC) revealed that (Fig. 6.2): (i) InfA_{1-P} exerted a bacteriostatic effect; (ii) InfA_{1-S} and InfA_{2-S} used independently did not exert anti-pneumococcal activity, and (iii) InfA_S (InfA_{1-S} and InfA_{2-S}) exerted a bactericidal profile characterized by a rapid and total decline (> 5 log) in the pneumococcal counts in the first hour after treatment, with no viable cells being detected for the subsequent 7 h of incubation.

VI.4.3. Effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on *S. pneumoniae* biofilms

In order to determine if InfA_S inhibits biofilm formation by *S. pneumoniae*, InfA_{1-S} and InfA_{2-S} (1:1 ratio) concentrations ranging from 50 to 2 μ M were added to nitrocellulose filter disks simultaneously to their inoculation with *S. pneumoniae* 66405 (1 \times 10⁵ cfu/ml). Bacterial counts obtained from the biofilms grown in the presence of 50, 25 and 12.5 μ M InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio), corresponding to 53, 26 and 13 \times MIC, respectively, revealed a decline of approximately 1.5 log in comparison with the untreated control, while a lower inhibitory effect (approx., 0.5 log reduction) was observed in the counts from the biofilms grown in the presence of 6.25-0.2 μ M InfA_S (InfA_{1-S} and InfA_{2-S}, 1:1 ratio), corresponding to 3.3-0.2 \times MIC, respectively (Fig. 6.3).

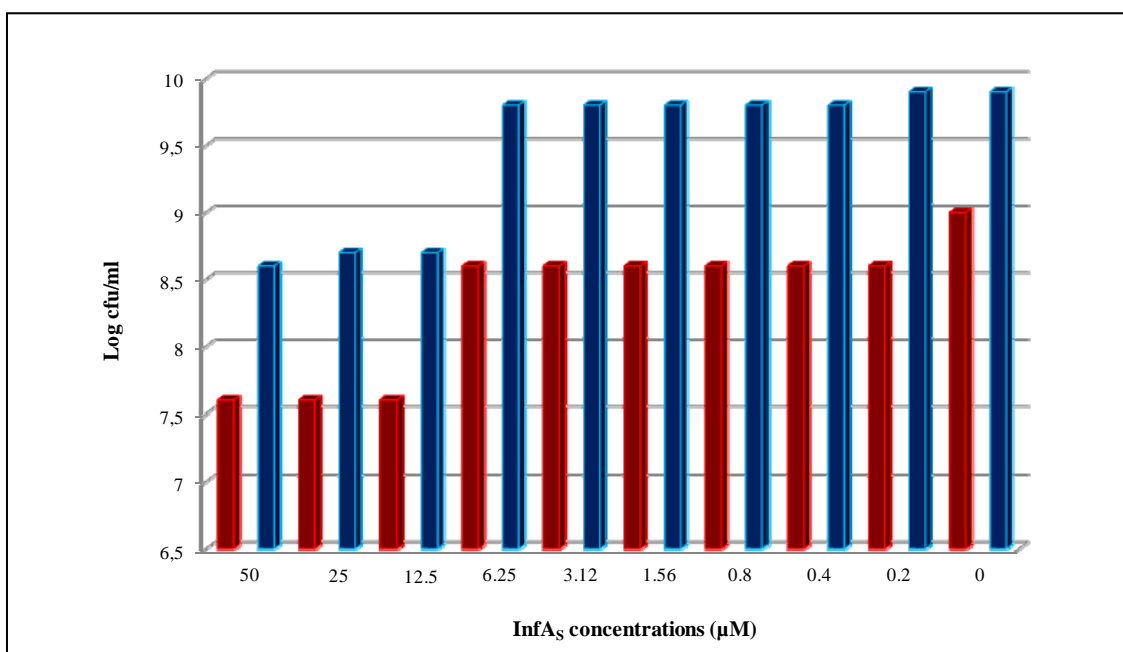


Figure 6.3. Effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on *S. pneumoniae* 66405 biofilm formation and pre-formed biofilms (red and blue bars, respectively).

No α -hemolytic activity was detected in the colonies obtained from the biofilms developed in the presence of 50, 25 and 12.5 μ M InfA_S (InfA₁-InfA₂; 1:1 ratio) (53, 26 and 13 \times MIC, respectively) (Fig. 6.4A) which attained a cell density $> 1 \times 10^7$ cfu/ml (Fig. 6.3). However, the proportion of hemolytic pneumococci increased gradually as bacteriocin concentration decreased despite of the fact that cell population remained rather constant (approx., 1×10^8 cfu/ml), being maximum at 0.2 μ M (Fig. 6.4B).

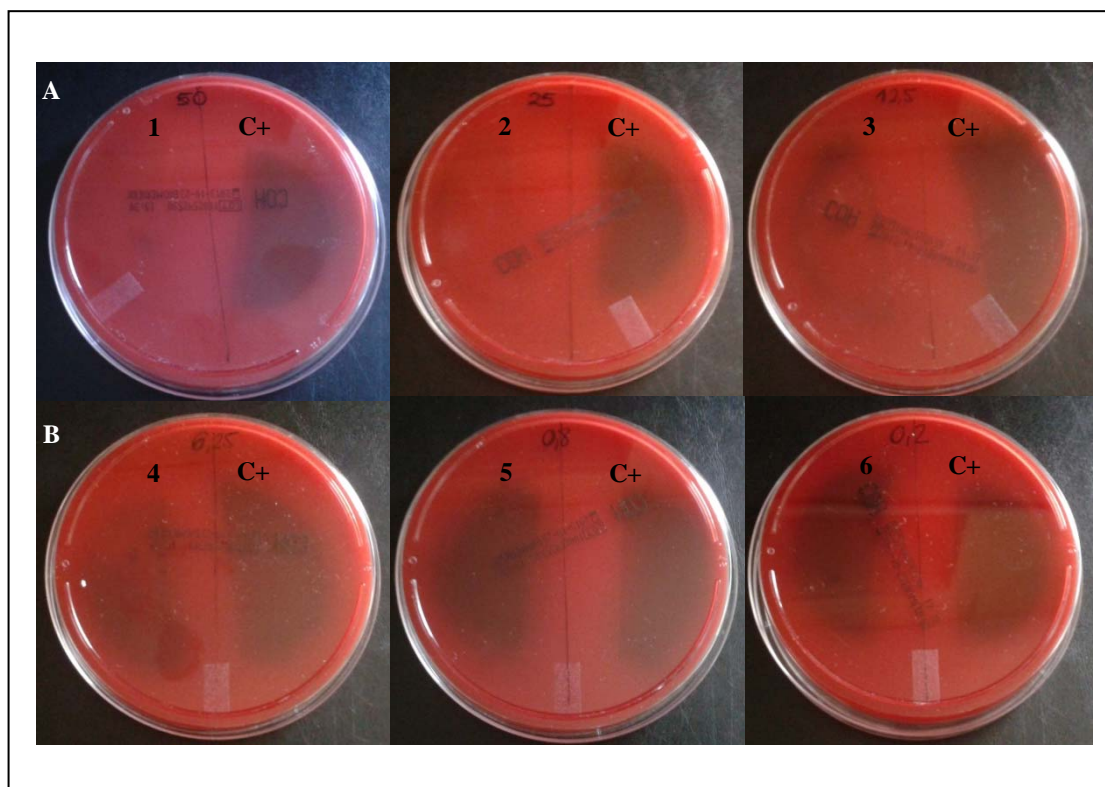


Figure 6.4. Effect of InfA_S (InfA₁-S-InfA₂-S; 1:1 ratio) on *S. pneumoniae* 66405 α -hemolytic activity. A: 50, 25 and 12.5 μ M of InfA_S (1), (2) and (3), respectively. B: 6.25, 0.8 and 0.2 μ M of InfA_S (4), (5) and (6), respectively; C+: untreated *S. pneumoniae* biofilm used as positive control.

Regarding the effect of InfA_S (InfA₁-S-InfA₂-S; 1:1 ratio) on preformed pneumococcal biofilms, a decline of 1.3, 1.2, and 1.2 log in the pneumococcal counts was observed after the addition of 50, 25 and 12.5 μ M InfA_S, respectively. However, no effect was observed in the biofilms treated with InfA_S concentrations in the range of 6.25-0.2 μ M (Fig. 6.3).

VI.4.4. Stability of InfA_S (InfA₁-S-InfA₂-S; 1:1 ratio) in human saliva

In order to determine the stability of InfA_S in human saliva, the synthetic peptides InfA₁-S and InfA₂-S (1:1 ratio) were dissolved at 50 μ M in sterilized human saliva and incubated at 37 °C for 0, 10 and 30 min, and 1, 4, and 8 h. Evaluation of the residual antimicrobial activity of the

peptides after incubation revealed that InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio): (i) exerted antimicrobial activity against *S. pneumoniae* 66405 in this biological fluid, and (ii) retained 100% of its original antimicrobial activity after 10 and 30 min, and 90% after 1, 4 and 8 h (Fig. 6.5).

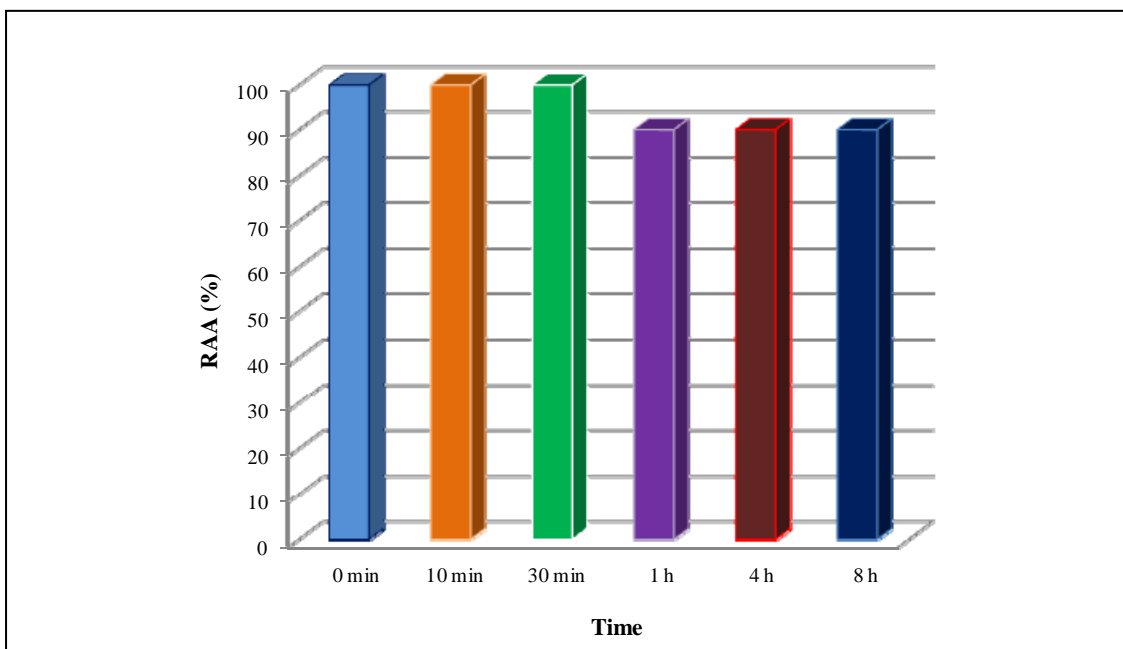


Figure 6.5. Functional stability of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) in human saliva. RAA: residual antimicrobial activity of the bacteriocin against *S. pneumoniae* 66405, as determined by a MPA.

VI.4.5. Mode of action of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) against *S. pneumoniae* in human saliva

To determine the mode of action of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on *S. pneumoniae* 66405 in human saliva, bacteriocin concentrations ranging from 0.937 to 7.5 μ M were evaluated. As shown in Fig. 6.6, all the tested bacteriocin concentrations resulted in lower pneumococcal counts than that of the untreated control (approx., 1×10^9 cfu/ml after 8 h incubation). The addition of 0.937 μ M InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) produced a 1.8 log decrease in the pneumococcal counts in the first hour, which remained stable up to 4 h after treatment. Regarding the exposure of *S. pneumoniae* 66405 to 1.9 μ M InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio), it resulted in a 2.5 log decrease in the first hour, followed by a slight increase at 4 h after treatment, and then the counts remained nearly stable for the additional 4 h. Likewise, the addition of 3.75 μ M InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) to *S. pneumoniae* 66405 resulted in a 3.6 log decrease in the pneumococcal counts in the first hour, which was maintained during the following 3h and was followed by an increase to count values similar to those observed in the cultures treated with 1.9 μ M InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) at 8 h after treatment. Finally, the

exposure of *S. pneumoniae* 66405 to 7.5 μ M InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) resulted in a total decline in pneumococcal counts in the first hour after treatment, and no viable counts were detected during the subsequent incubation up to 8 h.

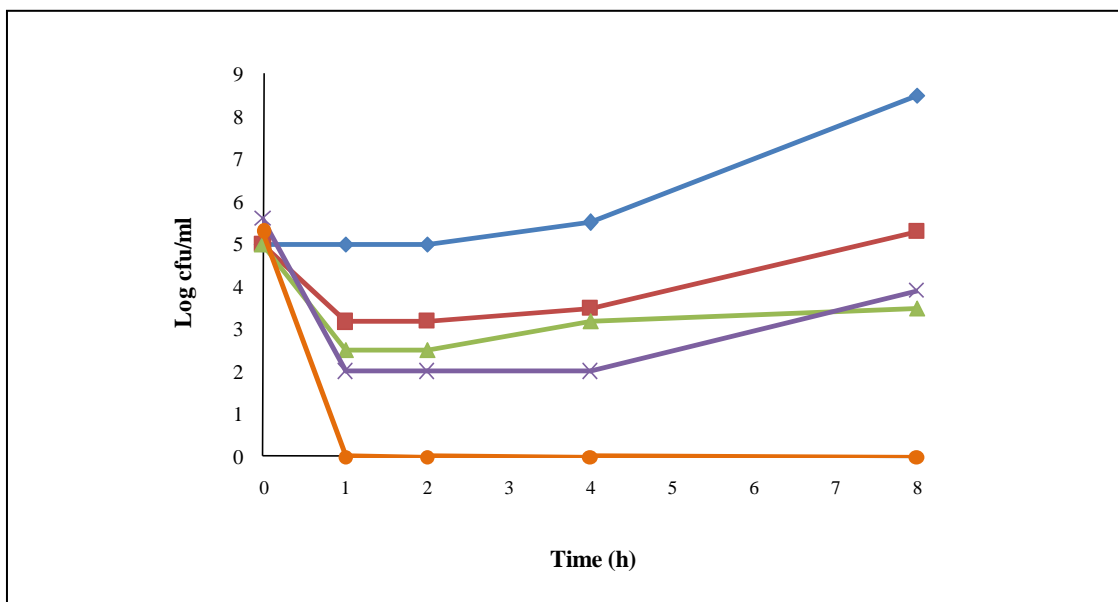


Figure 6.6. Mode of action of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) against *S. pneumoniae* 66405 in human saliva. —◆—, untreated culture; —■—, InfA_S (0.937 μ M); —▲—, InfA_S (1.9 μ M); —×—, InfA_S (3.75 μ M); —○—, InfA_S (7.5 μ M).

VI.4.6. Effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on saliva microbiota

The effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on the anaerobic microbiota of saliva was evaluated by comparing the bacterial counts and the taxonomic identification of colonies obtained in the presence and absence of this bacteriocin. Plate counting revealed that, prior to InfA_S (InfA_{1-S} and InfA_{2-S}, 1:1 ratio) addition, the total anaerobic population was 3.5×10^7 cfu/ml (Fig. 6.7), from which 80% were identified by PCR and nucleotide sequencing as *Streptococcus* spp.: (i) *Streptococcus oralis* (20%), (ii) *Streptococcus mitis* (20%), (iii) *Streptococcus australis* (10%), (iv) *Streptococcus infantis* (10%), (v) *Streptococcus cristatus* (10%), and (vi) *Streptococcus sanguinis* (10%), all of them included into viridans group streptococci. The remaining 20% of the isolates were identified as *Haemophilus parainfluenzae* (Fig. 6.8, panel A).

On the other hand, the addition of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) (50 μ M) resulted in approx. a 1.5 log reduction in the counts of total anaerobes after 10 min, which remained stable after 60 min (Fig. 6.7). When the composition of the surviving microbiota was analyzed, it was found that after 10 min of treatment the bacteriocin had considerably reduced the presence of *Streptococcus* spp. in human saliva. At this stage, the anaerobic microbiota was composed of

Streptococcus spp. (10%), *H. parainfluenzae* (20%) and *Staphylococcus aureus* (70%) (Fig. 6.8., panel B). After 30 min of treatment, the streptococci were not detected, and, while the *H. parainfluenzae* population remained constant (20%), *St. aureus* became the dominant species (80%) (Fig. 6.8., panel C). No further changes in the microbiota composition were detected after the additional 30 min of treatment (Fig. 6.8., panel D).

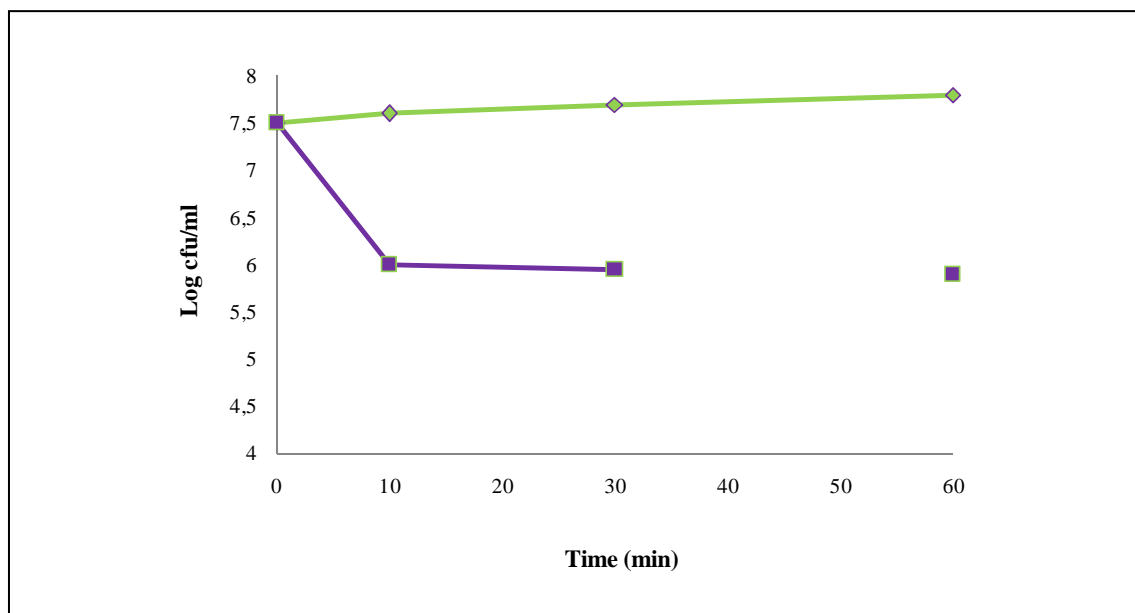


Figure 6.7. Effect of InfA₅ (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on total anaerobic counts of saliva. —◆—, untreated human saliva; —■—, InfA₅ (50 µM).

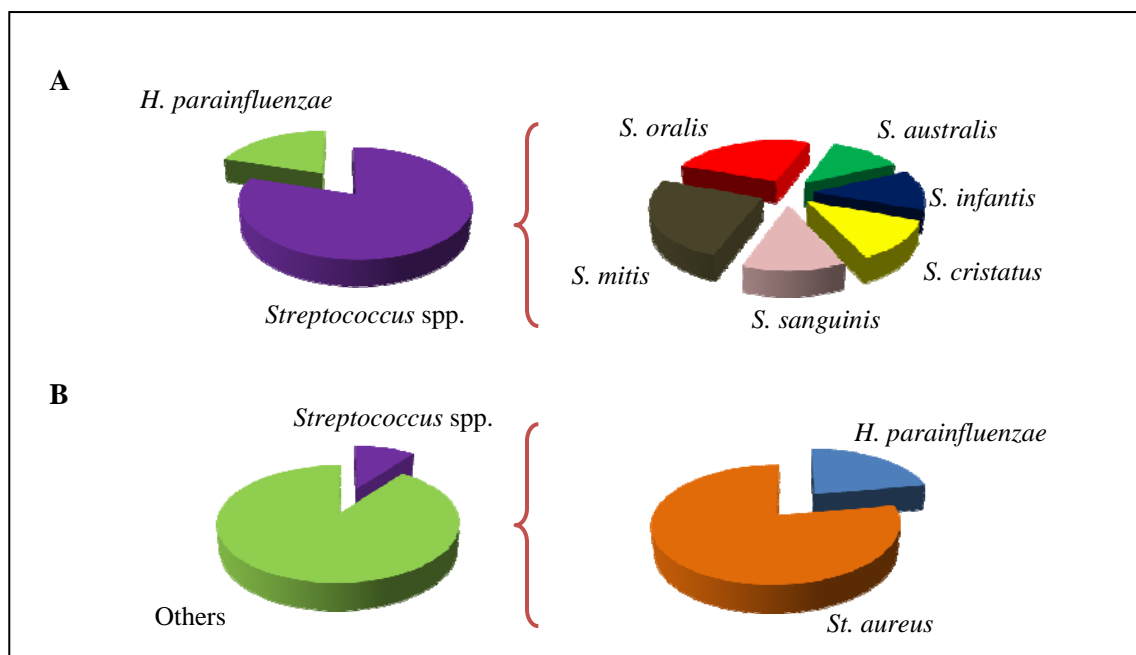


Figure 6.8. Effect of InfA₅ (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on the composition of salivary anaerobic microbiota. A: untreated human saliva. B, C and D: microbial composition of human saliva after incubation in the presence of InfA₅ (50 µM) at 37 °C for 10, 30 and 60 min, respectively.

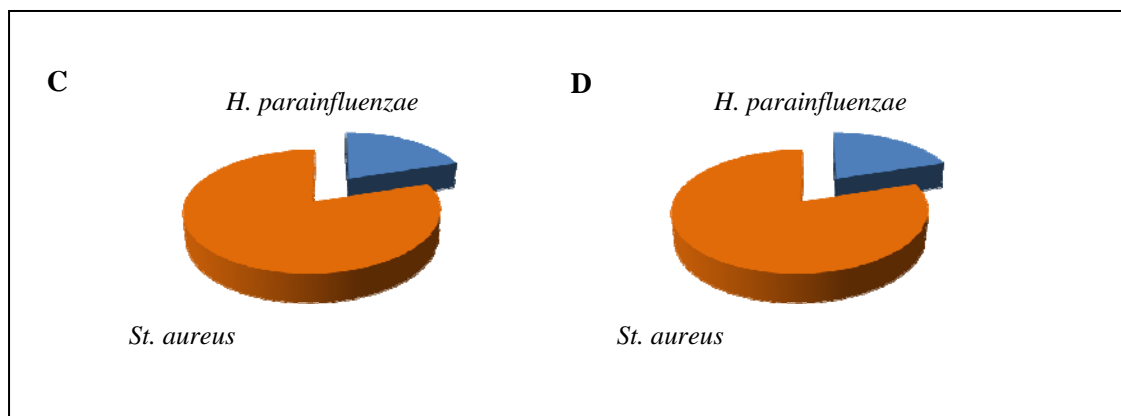


Figure 6.8. Continued.

VI.5. DISCUSSION

S. pneumoniae is an important cause of potentially life-threatening infections worldwide. Treatment of the diseases caused by this bacterium is challenging due to the emergence of (multi)drug-resistant *S. pneumoniae* phenotypes (Van Bambeke *et al.*, 2007) and to the pathogen's ability to form biofilms, which further reduces its susceptibility to antimicrobial agents (Domenech *et al.*, 2012). As a consequence, there is a need for the development of new antimicrobial strategies against *S. pneumoniae* to improve their clinical management. In this context, bacteriocins may constitute an attractive alternative or complement to the traditional antibiotic therapy (Cotter *et al.*, 2013). However, a thorough assessment is required before the introduction of a new antimicrobial agent into the clinical practice. In this work, the MICs of InfA_{1-P} and InfA_{1-S} and InfA_{2-S} assayed independently and combined at different ratios (2:1, 1:1 and 1:2) against *S. pneumoniae* 66405 were compared. The results revealed that InfA_{1-S} and InfA_{2-S} used independently do not display anti-pneumococcal activity. However, different combinations of the peptides showed a synergistic anti-pneumococcal effect, confirming that InfA₁ and InfA₂ constitute a two-peptide bacteriocin system. The requirement of both peptides for antimicrobial activity has been previously described for other similar systems, *e.g.*, lactacin 3147 (Ltn α and Ltn β) (Ryan *et al.*, 1996), thermophilin 13 (ThmA and ThmB) (Marciset *et al.*, 1997), and enterocin L50 (entL50A and entL50B) (Cintas *et al.*, 1998). The MICs obtained at 2:1 and 1:1 ratios (5.9 mg/ml) were 2-fold lower than that obtained at a 1:2 ratio (11.9 mg/ml), revealing that it is necessary an equal or higher amount of InfA₁ than InfA₂ to obtain the lowest MIC against *S. pneumoniae*. With regard to the killing kinetics of the anti-pneumococcal peptides produced by *S. infantarius* LP90 in BHI broth, the exposure of *S. pneumoniae* 66405 to the 20 \times CS from *S. infantarius* LP90 resulted in a bactericidal effect characterized by a rapid 3 log reduction in the first hour after treatment, and a drop > 5 log from the second hour. However, the exposure to InfA_{1-P} resulted in a bacteriostatic effect. Since we have previously shown that *S. infantarius* LP90 produces, in addition to InfA₁, the bacteriocin peptides InfB₁,

InfB₂, InfC₁ and InfG₁ when grown under the same experimental conditions used in this work (Chapter IV), the bactericidal profile displayed by the 20×CS, in contrast with the bacteriostatic effect exerted by InfA_{1-P}, might be due to a synergistic effect of the bacteriocins present in the CFS or to a lower concentration of InfA_{1-P} as a consequence of the purification process. On the other hand, InfA_{1-S} and InfA_{2-S} used independently do not exert anti-pneumococcal activity, further confirming that they constitute a two-peptide bacteriocin system, while displayed a remarkable bactericidal effect (> 5 log drop) when combined at a 1:1 ratio. The fact that both the inhibitory effect exerted by the 20×CS and InfA_S (InfA_{1-S}.InfA_{2-S}; 1:1 ratio) were characterized by a rapid and persistent reduction in pneumococcal counts further supports the hypothesis that InfA₂ could be present in the 20×CS (Chapter IV).

It is known that biofilm formation enhances the antimicrobial resistance of bacteria, being associated with up to 80% of all chronic infections (Domenech *et al.*, 2011). This mode of growth is common in the pneumococci colonizing the human nasopharynge, and it has been recently observed on the mucosal epithelium of children with recurrent or chronic middle ear infections (Moscoso *et al.*, 2009). In this respect, the ability of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) to prevent pneumococcal biofilm formation, as well as the effect of this two-peptide bacteriocin on pneumococcal biofilm reduction, was also analyzed in this work. The results obtained revealed a decline of 1.5 log in the pneumococcal counts from the biofilms grown in the presence of 50, 25 and 12.5 μM InfA_S as well as a lack or reduction of their α-haemolytic activity. These results indicate that InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) exerts an initial bactericidal effect followed by a bacteriostatic effect on *S. pneumoniae* biofilm formation. On the other hand, the effect of this bacteriocin on previously formed 24 h-biofilms was lower, ranging from 1.3 to 1.2 log reduction. It should be noted that, in both cases, the antimicrobial effect of these peptides on biofilms is much less efficient than on *S. pneumoniae* broth cultures (> 5 log at 0.937 μM InfA_S). In this context, several studies have shown a 10- to 1,000-fold increase in antimicrobial tolerance of biofilms when compared with cells grown planktonically (Davies, 2003). Several hypotheses have been proposed to explain this phenomenon, such as that the accumulation of waste products typical of biofilms would lead some microorganisms to enter a non-growing state (Stewart and Costerton, 2001) or that a subpopulation of bacteria could enter a highly protected phenotypic state similar to spore formation (Stewart *et al.* 2001), resulting in both cases in the cells being safeguarded from the action of some antimicrobials. Additionally, the inefficient action of the antimicrobials on bacterial cells in biofilms could be also due to the presence of an extracellular matrix of polymeric substances which would preclude antimicrobial access to the cells (Domenech *et al.*, 2012). In this respect, some agents could be potentially used in combination with bacteriocins for enhancing their antimicrobial effect, as proposed for antibiotics. Regarding this, the protein-lipid complex referred to as HAMLET (Human Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells) naturally present in human milk is highly effective in combination with antibiotics in the eradication of pneumococcal biofilms *in vitro* (Marks *et al.*,

2013). Likewise, cell wall hydrolases encoded by *S. pneumoniae* or its phages have been shown to be useful in the elimination of pneumococcal biofilms (Domenech *et al.*, 2011).

The potential use of bacteriocins for addressing human health concerns is a topic of utmost interest. In this context, the use of nisin, produced by several strains of *L. lactis*, as well as salivaricin A and salivaricin B, produced by *Streptococcus salivarius* 20P3 and *S. salivarius* K12, respectively, among other bacteriocins, for the treatment of human infections has been previously evaluated (Goldstein *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003; Chilcott and Tagg, 2005; Cotter *et al.*, 2005a; Tagg *et al.*, 2004; Tagg *et al.*, 2006; Gillor and Ghazaryan, 2007). Bacteriocins must meet specific requirements to be considered as effective drugs, including not only being active against the intended target pathogen, but also being stable in the proposed environment of use (Gillor *et al.*, 2005). In this context, InfA (InfA₁ and InfA₂) might be orally administered, independently or in combination with the conventional antibiotic treatment, to control pneumococcal infections. In this regard, evaluation of the functional stability of InfA_S (InfA_{1-S} and InfA_{2-S}) showed that it retained 90% of their original anti-pneumococcal activity after incubation in human saliva at 37 °C for 8 h, revealing that this biological fluid does not have a considerable negative impact on bacteriocin activity. Nevertheless, time-killing kinetic studies in human saliva showed that a much higher concentration of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) is needed for obtaining the same bactericidal profile as in BHI broth (7.5 vs. 0.937 µM). This observation is in contrast with the hypothesis on the possible synergistic activity between bacteriocins and the endogenous antimicrobial salivary enzymes (Dobson *et al.*, 2011). Moreover, since we have previously shown that InfA_{1-P} is not sensitive to amylase and is active under different pH values (Chapter III), including those normally encountered in saliva (pH range 6.5-7.4) (Pedersen *et al.*, 2002), the reasons responsible for the lower antimicrobial activity of this bacteriocin in saliva remains to be unraveled.

A relevant secondary effect of antimicrobial therapies is the promotion of changes in the composition and abundance of commensal microbes. In this context, it is known that in children with recurrent OM, repeated doses of antibiotics favour the emergence of resistant phenotypes and, at the same time, may reduce populations of the beneficial bacteria acting as barriers to colonization and/or growth of potential pathogens (Lazarevic *et al.*, 2013). For this reason, the effect of InfA_S (InfA_{1-S} and InfA_{2-S}) on anaerobic human saliva microbiota was also assessed. Untreated saliva incubated under anaerobic conditions was shown to contain 3.5×10⁷cfu/ml, consisting of viridans streptococci (80%) and *H. parainfluenzae* (20%). Viridans streptococci are considered as members of the indigenous microbiota of the upper respiratory tract, as well as early colonizers of the oral cavity (Könönen *et al.*, 2002). However, the addition of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) at 50 µM caused an approximately 1.5 log reduction in the counts of total anaerobes after 10, 30 and 60 min of treatment, including a 70% reduction of *Streptococcus* spp. after 10 min and their total and persistent inhibition after 30 min of incubation. On the other hand, while the percentage of colonies identified as *H. parainfluenzae* remained constant, *St. aureus* became the dominant species. Similar responses have been

observed in the nasopharyngeal microbiota upon the use of antibiotics for the treatment of upper respiratory infections (Soriano and Rodríguez-Cerrato, 2002). Moreover, amoxicillin, a first-line antibiotic for the treatment of OM, may promote the emergence of *St. aureus* in the nasopharynx when commensal microbes are killed by the antibiotic (Brook and Gober, 2009). Nevertheless, bacteriocins would still present, at least, an advantage with respect to antibiotics, since while orally-administered antibiotics are distributed to body compartments different to the infection foci, promoting the selection of resistant microorganisms in these areas (Soriano and Rodríguez-Cerrato, 2002), bacteriocins, due to their chemical nature, can be readily inactivated by gastric and pancreatic proteolytic enzymes, preventing their further distribution (Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005b) and therefore limiting the development of bacterial resistances.

In summary, our results suggest that InfA is a promising candidate for the treatment of pneumococcal infections, either alone or combined with other oral treatments. Possible alternatives to improve bacteriocin antimicrobial activity against pneumococcal biofilms, such as the use of different combinations of bacteriocins with different mechanisms of action or in combination with other agents, are under evaluation. Finally, *in vivo* studies will be also carried out in animal models with the ultimate goal of establishing if the *in vitro* antimicrobial activity of InfA (InfA₁ and InfA₂) can be translated into the clinical practice.

VI.6. REFERENCES

- Allegrucci, M., F. Z. Hu, K. Shen, J. Hayes, G. D. Ehrlich, J. C. Post, and K. Sauer. 2006. Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. *J. Bacteriol.*, 188: 2325-2335.
- Blanchette-Cain, K., C. A. Hinojosa, R. Akula, A. Lizcano, N. González-Juarbe, C. Muñoz-Almagro, C. J. Sanchez, M. A. Bergman, and C. J. Orihuela. 2013. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation is strain dependent, multifactorial, and associated with reduced invasiveness and immunoreactivity during colonization. *MBio*, 4: e00745-13.
- Brook, I. 2005. The role of bacterial interference in otitis, sinusitis and tonsillitis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 133: 139-146.
- Brook, I. and A. E. Gober. 2009. The effects of treatment of acute otitis media with a low dose vs a high dose of amoxicillin on the nasopharyngeal flora. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 135: 458-461.
- Chilcott, C. N. and J. R. Tagg: US20050079597 (2005).
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643-2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes, and L. S. Håvarstein. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180: 1988-1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández, and I. F. Nes. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and

L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806-6814.

Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*, 7: 281-305.

Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. 2005a. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 6: 61-75.

Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 777-788.

Cotter, P. D., L. H. Deegan, E. M. Lawton, L. A. Draper, P. M. O'Connor, C. Hill, and R. P. Ross. 2006. Complete alanine scanning of the two-component lantibiotic lactacin 3147 generating a blueprint for rational drug design. *Mol. Microbiol.*, 62: 735-747.

Cotter, P. D., R. P. Ross, and C. Hill. 2013. Bacteriocins- a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.*, 11: 95-105.

Daniels, R., P. Mellroth, A. Bernsel, F. Neiers, S. Normark, G. von Heijne, and B. Henriques-Normark. 2010. Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.*, 285: 3300-3309.

Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2: 114-122.

Davis, K. M., H. T. Akinbi, A. J. Standish, and J. N. Weiser. 2008. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.*, 4: e1000241.

Dobson, A., P. M. O'Connor, P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill. 2011. Impact of the broad-spectrum antimicrobial peptide, lactacin 3147, on *Streptococcus mutans* growing in a biofilm and in human saliva. *J. Appl. Microbiol.*, 111: 1514-1523.

Domenech, M., E. García, and M. Moscoso. 2011. *In vitro* destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55: 4144-4148.

Domenech, M., E. García, and M. Moscoso. 2012. Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Biotechnol.*, 5: 455-465.

Ehrlich, G., R. Veeh, X. Wang, J. W. Costerton, J. D. Hayes, F. Z. Hu, B. J. Daigle, M. D. Ehrlich, and J. C. Post. 2002. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA*, 287:1710-1715.

Faden, H., L. Duffy, R. Wasielewski, J. Wolf, D. Krystofik, and Y. Tung. 1997. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. *J. Infect. Dis.*, 175: 1440-1445.

Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 293-310.

García-Castillo, M., R. del Campo, F. Baquero, M. I. Morosini, M. C. Turrientes, J. Zamora, and R. Catón. 2011. Stationary biofilm growth normalizes mutation frequencies and mutant prevention

concentrations in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17: 704-711.

Gillor, O. and L. Ghazaryan. 2007. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 2: 115-122.

Gillor, O., L. M. Nigro, and M. A. Riley. 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.*, 11: 1067-1075.

Goldstein, B. P., J. Wei, K. Greenberg, and R. Novick. 1998. Activity of nisin against *S. pneumoniae*, *in vitro*, and in a mouse infection model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42: 277-278.

Hall-Stoodley, L., F. Z. Hu, A. Gieseke, L. Nistico, D. Nguyen, J. Hayes, M. orbes, D. P. Greenberg, B. Dice, A. Burrows, P. A. Wackym, P. Stoodley, J. C. Post, G. D. Ehrlich, and J. E. Kerschner. 2006. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*, 296: 202-211.

Henriques-Normark, B. and S. Normark. 2010. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp. Cell Res.*, 316: 1408-1414.

Holo, H., O. Nissen, and I. F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, 173: 3879-3887.

Kim, T. S., J. W. Hur, M. A. Yu, C. I. Cheigh, K. N. Kim, J. K. Hwng, and Y. R. Pyun. 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 66: 3-12.

Könönen, E., H. Jousimies-Somer, A. Bryk, T. Kilp, and M. Kilian. 2002. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J. Med. Microbiol.*, 51: 723-730.

Lazarevic, V., S. Manzano, N. Gaïa, M. Girard, K. Whiteson, J. Hibbs, P. François, A. Gervaix, and J. Schrenzel. 2013. Effects of amoxicillin treatment on the salivary microbiota in children with acute otitis media. *Clin. Microbiol. Infect.*, 19: E335-42.

Marciset, O., M. C. Jeronimus-Stratingh, B. Mollet, and B. Poolman. 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, 272: 14277-14284.

Marks, L. R., E. A. Clementi, and A. P. Hakansson. 2013. Sensitization of *Staphylococcus aureus* to methicillin and other antibiotics *in vitro* and *in vivo* in the presence of HAMLET. *PLoS One*, 8: e63158.

McCullers, J. A., Å. Karlström, A. R. Iverson, J. M. Loeffler, and V. A. Fischetti. 2007. Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.*, 3:e28.

Moscoso, M., E. García, and R. López. 2009. Pneumococcal biofilms. *Int. Microbiol.*, 12: 77-85.

Nes, I. F., D. B. Diep, and H. Holo. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189: 1189-1198.

Pedersen, A. M., A. Bardow, S. B. Jensen, and B. Nauntofte. 2002. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis.*, 8: 117-129.

Poyart, C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche, and P. Trieu-Cuot. 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 41-47.

- Regev-Yochay, G., K. Trzcinski, C. M. Thompson, R. Malley, and M. Lipsitch.** 2006. Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: *in vitro* hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 188: 4996-5001.
- Rodgers, G. L., A. Arguedas, R. Cohen, and R. Dagan.** 2009. Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 27: 3802-3810.
- Ryan, M. P., M. C. Rea, C. Hill, and R. P. Ross.** 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 612-619.
- Sánchez, C. J., N. Kumar, A. Lizcano, P. Shivshankar, J. C. Dunning Hotopp, J. H. Jorgensen, H. Tettelin, and C. J. Orihuela.** 2011. *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production. *PLoS One*, 6: e28738.
- Schuerman, L., D. Borys, B. Hoet, A. Forsgren, and R. Prymula.** 2009. Prevention of otitis media: now a reality? *Vaccine*, 27: 5748-5754.
- Soriano, F. and V. Rodríguez-Cerrato.** 2002. Pharmacodynamic and kinetic basis for the selection of pneumococcal resistance in the upper respiratory tract. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50: 51-58.
- Stewart, P. S. and J. W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358: 135-138.
- Tagg, J. R.** 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-streptococcus pyogenes bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J. Med. Res.*, 119: 13-16.
- Tagg, J. R., C. N. Chilcott, and J. P. Burton:** US20060171901 (2006).
- Van Bambeke, F., R. R. Reinert, P. C. Appelbaum, P. M. Tulkens, and W. E. Peetermans.** 2007. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections. Current and future therapeutic options. *Drugs*, 67: 2355-2382.
- Walls, T., D. Power, and J. Tagg.** 2003. Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by the normal flora of the nasopharynx: potential to protect against otitis media? *J. Med. Microbiol.*, 52: 829-833.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN INTEGRADORA

En este trabajo de investigación se procedió al estudio de la actividad antimicrobiana de una colección de bacterias lácticas bacteriocinogénicas aisladas de diferentes orígenes, así como de sus bacteriocinas, frente a aislados clínicos de *S. pneumoniae* con el objeto de evaluar su posible utilización como agentes terapéuticos como estrategia alternativa o complementaria al empleo de antibióticos en el tratamiento de las infecciones producidas por este importante patógeno humano. El interés de este estudio se fundamenta en la necesidad de explorar nuevas estrategias en la terapia antibacteriana no-antibiótica que resulten efectivas en el control de este patógeno, puesto que la tendencia creciente en el número de aislados clínicos de neumococos resistentes a uno o más antibióticos dificulta el tratamiento de los individuos afectados. Esta estrategia no sólo sería de utilidad como alternativa terapéutica, sino que además permitiría reducir la tasa de aparición de bacterias patógenas multirresistentes a los antibióticos como consecuencia de la disminución en el empleo de los mismos, así como la aparición de disbiosis. A este respecto, conviene destacar que, de forma general, existen dos estrategias para emplear las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas en la terapia de las infecciones producidas por *S. pneumoniae*: (i) administración directa de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas como preparaciones probióticas, una vez evaluada su seguridad y (ii) administración de las bacteriocinas purificadas o parcialmente purificadas en forma de preparados farmacéuticos que permitan la descontaminación de la nasofaringe. En este contexto, en este trabajo de investigación se han utilizado diversas técnicas microbiológicas, bioquímicas y genéticas para la consecución de los siguientes objetivos:

1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de una colección de BAL bacteriocinogénicas de distintos orígenes, principalmente alimentario, frente a aislados clínicos de *S. pneumoniae*: evaluación *in vitro* de la seguridad de *S. infantarius* LP90 y caracterización bioquímica de la bacteriocina antineumocócica InfA₁ (3.963 Da).
2. Análisis genético y transcripcional del *cluster* génico de InfA (InfA₁-InfA₂) de *S. infantarius* LP90.
3. Evaluación de la producción heteróloga de InfA₁ e InfA₂ por *Pc. pastoris* y *L. lactis*.
4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}) frente a *S. pneumoniae* en caldo de cultivo, saliva humana y un sistema modelo de *biofilm*.

VII.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA COLECCIÓN DE BAL BACTERIOCINOGENICAS DE DISTINTOS ORÍGENES FRENTE A AISLADOS CLÍNICOS DE *S. pneumoniae*: EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA SEGURIDAD DE *S. infantarius* LP90 Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BACTERIOCINA ANTINEUMOCÓCICA INFA₁

VII.1.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA COLECCIÓN DE BAL BACTERIOCINOGENICAS DE DISTINTOS ORÍGENES FRENTE A AISLADOS CLÍNICOS DE *S. pneumoniae*

Las infecciones producidas por *S. pneumoniae* constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Braido *et al.*, 2008; Rightmier *et al.*, 2011). Actualmente, el tratamiento de estas infecciones, entre las que se incluyen la otitis media aguda, la sinusitis, la neumonía, la bacteriemia y la meningitis, presenta importantes retos debido a la emergencia de cepas neumocócicas resistentes a uno o varios antibióticos (McGee *et al.*, 2001; Van Bambeke *et al.*, 2007). A este respecto, las bacteriocinas producidas por BAL podrían constituir una estrategia alternativa o complementaria a la antibioterapia tradicional. Varios estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas secretadas por BAL frente a *S. pneumoniae*, incluyendo: (i) NisA producida por cepas de *L. lactis* (Goldstein *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2013), considerada la bacteriocina mejor caracterizada hasta la fecha y la única aceptada internacionalmente como aditivo alimentario (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Cotter *et al.*, 2005b; Healy *et al.*, 2013); (ii) el péptido antimicrobiano AP-CECT7121 producido por *E. faecalis* CECT7121 (Sparo *et al.*, 2009) y (iii) las salivaricinas B y D, dos lantibióticos producidos por *S. salivarius* K12 y *S. salivarius* 5M6c, respectivamente (Wescombe *et al.*, 2009; Birri *et al.*, 2011). Además, conviene destacar que bacteriocinas y antibióticos difieren en su síntesis, modo de acción, toxicidad y, lo más importante, en los mecanismos de resistencia que pueden desarrollar las células diana (Cleveland *et al.*, 2001) (sección II.2.1.1.1). Así, mientras la aparición de resistencias a los antibióticos está ligada a la presencia de genes específicos y transferibles entre cepas y especies, la resistencia a bacteriocinas se produce normalmente como resultado de cambios en la membrana celular (Cleveland *et al.*, 2001; Riley y Wertz, 2002; Piper *et al.*, 2009b). Sin embargo, debe también mencionarse que recientes estudios han demostrado la existencia de otros mecanismos de resistencia a bacteriocinas, incluyendo: (i) la aparición de mutaciones en genes que codifican receptores específicos intracelulares (Yuzenkova *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2013); (ii) la presencia de proteínas de inmunidad frente a una bacteriocina determinada en cepas no productoras de la misma o en cepas productoras de bacteriocinas estrechamente relacionadas (Drapper *et al.*, 2009; Cotter *et al.*, 2013) y (iii) el procesamiento proteolítico de las bacteriocinas (Sun *et al.*, 2009; Cotter *et al.*, 2013). Con el objeto de evitar o disminuir el desarrollo potencial de resistencias frente a las bacteriocinas se han propuesto diversas soluciones, entre las que se incluyen las siguientes: (i) diseño de péptidos modificados capaces

de unirse a receptores que hayan sufrido algún tipo de mutación; (ii) modificación de péptidos con el fin de obtener variantes con una sensibilidad reducida frente a proteasas, y (iii) empleo combinado de bacteriocinas con distintos mecanismos de acción o de bacteriocinas y otros antimicrobianos (Cotter *et al.*, 2013). Asimismo, conviene destacar que, aunque se han descrito algunos casos, la aparición de resistencias cruzadas entre bacteriocinas y antibióticos es poco probable. Además diversos estudios han demostrado la eficacia de algunas bacteriocinas frente a microorganismos resistentes a múltiples antibióticos (Severina *et al.*, 1998; Galvin *et al.*, 1999), así como la existencia de bacterias resistentes a bacteriocinas que, sin embargo, muestran una mayor susceptibilidad a antibióticos (Gravesen *et al.*, 2001; Martínez y Rodríguez, 2005) (sección II.2.2.8.1).

En este trabajo, se evaluó la actividad antineumocócica de 38 BAL bacteriocinogénicas aisladas de embutidos crudos curados, leche y productos lácteos, diversas especies acuícolas y productos de la pesca, y canales y heces de patos y palomas, así como de muestras clínicas de origen humano, frente a aislados clínicos de *S. pneumoniae* con diversos patrones de susceptibilidad a los antibióticos de mayor relevancia en medicina humana con el objeto de identificar las cepas más activas. Para ello, en primer lugar, se determinó su actividad antimicrobiana directa mediante ISP (Cintas *et al.*, 1995) frente a nueve microorganismos indicadores (Tabla III.1, sección III.3.1). La actividad antineumocócica, cuantificada mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición producidos, reveló que todas las BAL ejercieron un amplio espectro antimicrobiano e inhibieron a la práctica totalidad de los aislados de *S. pneumoniae* evaluados (Tabla III.5, sección III.4.1). Posteriormente, con el objeto de identificar las cepas cuya actividad antimicrobiana no era debida a la competencia por los sustratos del medio de cultivo ni al descenso del pH producido como consecuencia de su metabolismo fermentativo, sino a la producción de bacteriocinas, las 38 BAL se desarrollaron en caldo MRS y se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes libres de células de los cultivos esterilizados por filtración (en adelante, sobrenadantes) para, posteriormente, evaluar su actividad antagonista mediante TDA (Cintas *et al.*, 1995) frente a 23 microorganismos indicadores (Tabla III.1, sección III.3.1). La actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes se cuantificó mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición producidos. Los resultados obtenidos (Tabla III.5, sección III.4.1) mostraron que la mayoría de las BAL evaluadas (32; 84,2%) presentaban actividad antimicrobiana frente a, al menos, uno de los aislados de *S. pneumoniae* evaluados. De estas 32 cepas, seis (*Streptococcus* sp. LP90, *L. lactis* BB24, *E. faecalis* DBH18, *E. faecium* BNM58, *L. garvieae* DCC43 y *E. faecium* L50) destacaron por su potente actividad antineumocócica. En este contexto, *Streptococcus* sp. LP90, una cepa aislada de leche de búfala de Venezuela (Citti, 2005) e identificada taxonómicamente en este trabajo como *S. infantarius* subsp. *infantarius*, destacó por su potente y amplio espectro de acción frente *S. pneumoniae*, por lo que fue seleccionada para posteriores estudios.

VII.1.2. EVALUACIÓN *in vitro* DE LA SEGURIDAD DE *S. infantarius* LP90

La especie *S. infantarius*, perteneciente al SBSEC, ha sido aislada de diversos orígenes (sección II.1.5.1.3). A este respecto, distintos estudios han descrito el aislamiento de *S. infantarius* de (i) productos lácteos obtenidos mediante fermentaciones espontáneas o la técnica *back-slopping*, en cuya elaboración parece desempeñar un papel fundamental (Tabla II.2, sección II.1.3.1) (Abdelgadir *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2009; Wullschleger, 2009; Jan *et al.*, 2012a); (ii) bebidas fermentadas obtenidas a partir de cereales (Mukisa *et al.*, 2012), y (iii) guisantes congelados (Hoshino *et al.*, 2005; Schlegel *et al.*, 2000). Conviene destacar que esta especie también se empleó como aditivo en alimentación animal en la UE. A este respecto, la cepa *S. infantarius* CNCM I-841, combinada con *Lb. plantarum* CNCM I-840 y comercializada como Adjulact 2000®, estuvo autorizada como probiótico para terneros por la antigua Directiva 70/524/CEE sobre aditivos en alimentación animal. No obstante, desde el fin de la autorización para su comercialización (17 de julio de 2004) no se ha vuelto a incluir ninguna cepa de *S. infantarius* en el Registro Comunitario de Aditivos para Alimentación Animal de la UE. Por otra parte, esta especie también ha sido aislada de heces de niños y muestras clínicas de pacientes con endocarditis (Schlegel *et al.*, 2000; Hoshino *et al.*, 2005). Atendiendo a su aislamiento de personas enfermas, *S. infantarius* podría ser considerada una especie potencialmente patógena para los humanos. A este respecto, el gen *gtf*, que codifica la enzima glucosiltransferasa y que ha sido detectado en esta especie, es considerado un factor de virulencia potencial por ser responsable de la biosíntesis de una cápsula extracelular de polisacáridos que protege frente a la respuesta inmunitaria del hospedador (sección II.1.5.4.1.1) (Heraief *et al.*, 1982; Abdelgadir *et al.*, 2008). Con el objeto de determinar si *S. infantarius* LP90 posee el gen que codifica tanto este como otros factores de virulencia descritos en estreptococos y enterococos, se realizó un estudio exhaustivo de la seguridad *in vitro* de esta cepa que incluyó, además, la: (i) determinación de su sensibilidad/resistencia a diversos antibióticos empleados en medicina humana; (ii) evaluación fenotípica y genética de la producción de aminas biógenas, y (iii) detección fenotípica de diversas actividades enzimáticas, entre las que se incluyeron la degradación de la mucina y la desconjugación de las sales biliares. Los resultados de estos ensayos revelaron que los genes que codifican la enzima glucosiltransferasa y demás factores de virulencia evaluados en este trabajo no están presentes en *S. infantarius* LP90. Por otra parte, la determinación de la concentración mínima inhibidora (CMI) mediante un ensayo de microdilución en caldo de cultivo puso de manifiesto que esta cepa es sensible a ampicilina, vancomicina, eritromicina, tetraciclina, clindamicina, cloranfenicol, kanamicina, gentamicina y estreptomina, de acuerdo con los puntos de corte establecidos por la EFSA (2012a) para *S. thermophilus* (Tabla III.8, sección III.4.5). Asimismo, debido a la ausencia de puntos de corte propuestos por la EFSA para penicilina, linezolid, rifampicina, ciprofloxacina, trimetoprim, virginiamicina y neomicina, los resultados obtenidos para los cinco primeros antibióticos se compararon con los valores de CMI descritos para *S. thermophilus* LC201 ($\leq 0,06$, 2, 0,03, 4 y >32 , respectivamente) (Karapetkov *et al.* 2011). De

acuerdo con estos resultados, *S. infantarius* LP90 muestra la misma CMI para la penicilina que *S. thermophilus* LC201 y valores inferiores de CMI para linezolid, ciprofloxacina y trimetoprim. Únicamente la CMI de *S. infantarius* LP90 para la rifampicina presenta un valor superior al detectado para *S. thermophilus* LC201. Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que *S. infantarius* LP90 posee un patrón de sensibilidad/resistencia a los antibióticos similar al de *S. thermophilus*, una especie empleada como cultivo iniciador en la elaboración de productos lácteos como el yogur y el queso (Hols *et al.*, 2005; Delorme, 2008; Prajapati *et al.*, 2013). Por otra parte, se conoce que las BAL pueden estar implicadas en la producción de aminas biógenas en alimentos fermentados, lo que podría constituir un riesgo para la salud pública (Silla, 1996; Muñoz-Atienza *et al.*, 2011); sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que *S. infantarius* LP90 no produce ninguna de las aminas biógenas analizadas. En cuanto al resto de actividades enzimáticas evaluadas, la actividad β -glucuronidasa ha sido asociada con la generación de metabolitos potencialmente cancerígenos (Heavey *et al.*, 2004), mientras que una degradación excesiva de mucina podría facilitar la translocación bacteriana a los tejidos extraintestinales (Ruseler-van Embden *et al.*, 1995). Asimismo, aunque la habilidad de desconjugación de las sales biliares en las cepas probióticas ha sido considerada comúnmente como una propiedad beneficiosa, actualmente está siendo cuestionada dado que grandes cantidades de sales biliares desconjugadas y/o los ácidos biliares secundarios resultantes de su modificación (deshidroxilación) pueden tener efectos nocivos para la salud (*e.g.* dificultad en la digestión de ácidos grasos, daño en el ADN, potenciación del desarrollo de cáncer de colon o alteración de la función de la mucosa del colon, lo que conlleva la aparición de diarreas e inflamación) (Begley *et al.*, 2005, 2006). A este respecto, los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que *S. infantarius* LP90 no presenta actividad β -glucuronidasa ni mucinolítica, ni habilidad para desconjugar las sales biliares. Considerados globamente, estos resultados ponen de manifiesto que *S. infantarius* LP90 puede considerarse una cepa potencialmente segura.

VII.1.3. PURIFICACIÓN, ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SECUENCIA AMINOACÍDICA DE INF_{A1} (3.963 Da)

A continuación, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de la bacteriocina antineumocócica Inf_{A1} (3.963 Da) producida por *S. infantarius* LP90. En primer lugar y con el objeto de evaluar la influencia del medio de cultivo y de las condiciones de incubación sobre el crecimiento, pH y actividad antineumocócica de *S. infantarius* LP90, así como de determinar las condiciones de cultivo óptimas para la producción de Inf_{A1} (3.963 Da), esta cepa se desarrolló en los medios de cultivo líquido MRS y GM17 a 37° C bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, y en BHI, TSB y THB a 37° C en aerobiosis. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el crecimiento, el pH y, especialmente, la actividad antineumocócica dependen del medio de cultivo empleado (Tabla III.7, sección III.4.3). La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos a las 10, 12, 14, 16 y 18 h frente a *S. pneumoniae*, evaluada mediante

EPM (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000d), se detectó en caldo MRS, y, en menor medida, en caldo GM17. A este respecto, la influencia del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocinas ha sido descrita en varios estudios y, concretamente, la del medio MRS parece ser especialmente positiva (Mataragas *et al.*, 2004; Todorov y Dicks, 2004; Zalán *et al.*, 2005; Basanta *et al.*, 2008). Asimismo, la máxima actividad antineumocócica (120 UB/ml) se detectó en los sobrenadantes de los cultivos desarrollados en caldo MRS bajo condiciones aeróbicas tras alcanzar la fase estacionaria (10-12 h de incubación). A este respecto, estudios previos también han descrito que la concentración de bacteriocina es máxima al final de la fase logarítmica o al inicio de la fase estacionaria (Parente y Hill, 1992; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Franz *et al.*, 1996; Criado *et al.*, 2006).

Una vez determinadas las condiciones de cultivo óptimas de *S. infantarius* LP90 para una mayor producción de InfA₁ (3.963 Da), se llevó a cabo su caracterización bioquímica mediante la purificación a homogeneidad de este péptido antimicrobiano a partir de un sobrenadante de un cultivo de *S. infantarius* LP90 empleando, para ello, un protocolo multicromatográfico. El protocolo de purificación que mayor difusión ha alcanzado en el campo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se basa en el pequeño tamaño molecular, naturaleza catiónica y relativa hidrofobicidad de estas moléculas (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 2001). De forma general, este protocolo incluye: (i) el crecimiento de la cepa bacteriocinogénica en un medio líquido bajo las condiciones óptimas para la producción de las bacteriocinas; (ii) la obtención del correspondiente sobrenadante libre de células mediante centrifugación; (iii) la precipitación de las proteínas presentes en el sobrenadante mediante la adición de sulfato amónico y, por último, (iv) diversas etapas cromatográficas, entre las que incluyen las cromatografías de intercambio iónico (aniónico o catiónico), interacción hidrofóbica y fase inversa en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*). Asimismo, algunos autores han descrito una variante de este protocolo que incluye una etapa cromatográfica de filtración en gel previa al intercambio catiónico (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1997; Casaus *et al.*, 1997; Herranz *et al.*, 2001). Tras el proceso de purificación empleado en este trabajo, se obtuvo una única fracción con actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae* (Fig.3.2 y Tabla III.9, sección III.4.7), cuya pureza y masa molecular se determinaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Este análisis reveló la presencia en la fracción analizada de un péptido antimicrobiano con una masa molecular de 3.963 Da (Fig. 3.3, sección III.4.7). Por otra parte, la determinación mediante degradación N-terminal de Edman de la secuencia aminoacídica de InfA₁ (3.963 Da) permitió la obtención de la secuencia SIAVKLVNQGFGAIXSFID (Fig. 3.4, sección III.4.7), en la que “X” indica un ciclo en blanco en el que no se detectó ningún aminoácido conocido. Conviene destacar que en esas posiciones es razonable esperar que el residuo corresponda a cisteína (Cys), que formaría un puente disulfuro con una segunda Cys, y, por lo tanto, no produciría señal (ciclo en blanco) en la reacción de degradación de Edman. Esta secuencia se comparó con las depositadas en diversas bases de datos de proteínas mediante el programa *BLAST* del *NCBI*, lo

que puso de manifiesto que la secuencia aminoacídica de la región N-terminal de InfA₁ (3.963 Da) producida por *S. infantarius* LP90 presenta una alta homología (74% de identidad) con una hipotética proteína de función biológica desconocida de *S. infantarius* ATCCBAA-102 presente en la base de datos *GenBank* (código de acceso ZP_02920122.) (Fig. 3.4, sección III.4.7).

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteica y, en su mayoría, termorresistentes, que son liberados al medio extracelular (Cintas *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 2007; Brandão *et al.*, 2010). En este contexto, se procedió a determinar la estabilidad físico-química de la bacteriocina antineumocócica secretada por *S. infantarius* LP90, para lo cual los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de *S. infantarius* LP90 se sometieron a tratamiento térmico o enzimático, así como a un ensayo para determinar su estabilidad a diferentes valores de pH. Finalizados los ensayos, se determinó la actividad antineumocócica residual de los sobrenadantes mediante TDA. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que InfA₁ es termorresistente, estable a diferentes valores de pH y sensible a la acción de las enzimas proteolíticas proteinasa K y pepsina.

La producción de bacteriocinas por especies pertenecientes al SBSEC ha sido descrita previamente; entre ellas, se incluyen: (i) cuatro lantibióticos (bovicina HC5, bovicina HJ50 y macedocina y macedovicina, producidos por *Streptococcus bovis* HC5, *S. bovis* HJ50 y *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198, respectivamente), (ii) la bovicina 255, producida por *S. gallolyticus* LRC0255, que presenta características similares a las bacteriocinas de la clase II, y (iii) una bacteriocina producida por *S. bovis* J2 40-2 (Whitford *et al.*, 2001; Mantovani *et al.*, 2002; Georgalaki *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2009; Georgalaki *et al.*, 2013). Sin embargo, debe subrayarse que InfA₁ (3.963 Da) constituye la primera bacteriocina descrita en la especie *S. infantarius*, que, además, ha sido caracterizada, así como que, a diferencia de la mayoría de las bacteriocinas producidas por los estreptococos, no contiene aminoácidos modificados, por lo que pertenece a la clase II (no lantibióticos).

VII.2. ANÁLISIS GENÉTICO Y TRANSCRIPCIONAL DEL CLUSTER GÉNICO DE INFA (INFA₁-INFA₂)

VII.2.1. SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA Y ANÁLISIS DEL CLUSTER GÉNICO DE INFA (INFA₁-INFA₂) EN *S. infantarius* LP90

Con el objeto de conocer la secuencia nucleotídica del gen estructural de InfA₁, así como de los genes implicados en su transporte, inmunidad y regulación de su producción, se diseñaron parejas de cebadores específicos basados en la secuencia nucleotídica de la región en la que se encuentra la citada proteína hipotética homóloga de *S. infantarius* ATCCBAA-102 para amplificar secuencialmente fragmentos de aproximadamente 500 pb, obteniéndose una secuencia final de 17.730 pb de *S. infantarius* LP90 (Fig.4.1, sección IV.4.1). El análisis de esta secuencia nucleotídica mediante el programa *BLAST* del *NCBI* reveló que el gen estructural de

InfA₁ forma parte de un *cluster* multibacteriocinogénico constituido por 29 ORF (*orf1-orf29*) con una homología del 99% con *S. infantarius* ATCCBAA-102 (Tabla IV.1 y Fig.4.2, sección IV.4.1), localizados con la misma orientación (excepto *orf1*, *orf2*, y *orf29*) y precedidos por hipotéticos RBS, excepto *orf14* y *orf21* (Figs. 4.1 y 4.2, sección IV.4.1). Estos ORF podrían agruparse en tres regiones funcionales diferentes (Fig. 4.2, sección IV.4.1): región I (*orf1-orf2*), implicada en la secreción de las bacteriocinas y del péptido inductor y aparentemente organizada en un único operon; (ii) región II (*orf3* a *orf26*), implicada en la biosíntesis e inmunidad de siete hipotéticas bacteriocinas y organizada hipotéticamente en siete operones, y (iii) región III (*orf27-orf29*), relacionada con la regulación de la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis, secreción e inmunidad de las bacteriocinas y aparentemente organizada en dos operones. Más concretamente, los resultados del análisis informático revelaron la presencia en la región II del gen estructural de la InfA₁ (*orf8*), así como de otros once genes (*orf3-orf7*, *orf12-orf13*, *orf15*, *orf17*, y *orf19-orf20*), responsables de codificar péptidos caracterizados por presentar una masa molecular menor de 6 kDa y un elevado pI (Tabla IV.2, sección IV.4.1), como sucede con las bacteriocinas pertenecientes a las clases I y II (Nes *et al.*, 1996). Además, todos ellos contienen una extensión N-terminal del tipo secuencia líder doble glicina (sección II.2.2.1) de 15-30 aminoácidos (Fig.4.1, sección IV.4.1), típica de las bacteriocinas secretadas por un transportador del tipo ABC (Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003). Asimismo, conviene destacar que, excepto los péptidos codificados por *orf7* y *orf8* (InfA₁), los codificados por el resto de genes (*orf3-orf6*, *orf12-orf13*, *orf15*, *orf17*, y *orf19-orf20*) presentan homología con bacteriocinas descritas en diversas especies estreptocócicas o con péptidos estimulantes de la actividad antimicrobiana (Tabla IV.1, sección IV.4.1). A este respecto, atendiendo a la elevada homología que presentan con otras bacteriocinas de la clase IIb (sistemas de dos péptidos), así como a su localización en tándem, diez de los doce genes estructurales codificarían los cinco sistemas de dos péptidos siguientes: (i) InfC (InfC₁ [*orf4*] e InfC₂ [*orf3*]), (ii) InfB (InfB₁ [*orf6*] e InfB₂ [*orf5*]), (iii) InfA (InfA₁ [*orf8*] e InfA₂ [*orf7*]), (iv) InfD (InfD₁ [*orf12*] e InfD₂ [*orf13*]) y (v) InfG (InfG₁ [*orf19*] e InfG₂ [*orf20*]). Por lo tanto, de acuerdo con esta organización genética, así como con el efecto antineumocócico sinérgico de los péptidos recombinantes InfA₁ e InfA₂ producidos por *Pc. pastoris* y *L. lactis* combinados en proporción 1:1 (secciones V.4.2 y V.4.4), InfA₁ (*orf8*) e InfA₂ (*orf7*) constituyen la bacteriocina antineumocócica denominada InfA (subclase IIb o sistema de dos péptidos). Por otra parte, los dos genes estructurales restantes (*orf15* y *orf17*) codificarían InfE e InfF, ambas constituidas por un único péptido y que, de acuerdo con su secuencia aminoacídica, pertenecerían a la clase IIa (aunque con una modificación en la secuencia consenso N-terminal, *i.e.*, YGNGLYC en vez de YGNGVXC) y a la clase IIe, respectivamente. Diversos *loci* con características típicas de las agrupaciones génicas de las bacteriocinas de la clase II han sido identificados en los genomas de distintas especies estreptocócicas, entre las que se incluyen las siguientes: (i) *blp_{Sp}* en *S. pneumoniae* (De Saizieu *et al.*, 2000); (ii) *blp_{St}* en *S. thermophilus* (Fontaine *et al.*, 2007); (iii) *bsm* y *loci* de las mutacinas IV y V en *Streptococcus mutans* (Hale *et al.*, 2005; Van der Ploeg,

2005) y (iv) *sil* en *Streptococcus pyogenes* (Hidalgo-Grass *et al.*, 2002). Asimismo, aunque la presencia de un elevado número de genes que codifican bacteriocinas parece ser una característica común de varias especies estreptocócicas (Van der Ploeg, 2005; Fontaine *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007), *S. infantarius* LP90 constituye hasta la fecha la cepa en la que se ha descrito un mayor número de genes estructurales de las mismas. El análisis informático de la secuencia nucleotídica obtenida en este trabajo también reveló la homología de cinco genes localizados en la región II (*orf10*, *orf11*, *orf16*, *orf25* y *orf26*) con proteínas de inmunidad de bacteriocinas, así como la de *orf9* con una proteasa CAAX amino terminal, también conocida como proteína Abi, que también ha sido relacionada con la capacidad de conferir inmunidad a la célula frente a la(s) bacteriocina(s) secretada(s) por la misma (Kjos *et al.*, 2010). Las proteínas codificadas por *orf9*, *orf10*, *orf25* and *orf26* contienen seis, tres, tres y dos segmentos transmembrana, respectivamente, lo que apoya la hipótesis de que constituyen proteínas de inmunidad para la célula productora (Diep *et al.*, 1996). Sin embargo, *orf11* y *orf16* codifican proteínas solubles. En este sentido, la proteína de inmunidad de la lactococina A, que no posee las características típicas de las proteínas de membrana, contiene una hipotética hélice- α anfipática que podría atravesar la membrana y, en presencia de la bacteriocina, interactuar con el complejo receptor-bacteriocina evitando así la permeabilización de la membrana (Nissen-Meyer *et al.*, 1993; Venema *et al.*, 1994; Diep *et al.*, 2007). Respecto a su localización, conviene destacar que los genes que codifican la mayoría de las proteínas de inmunidad de bacteriocinas de la clase II (no lantibióticos) se encuentran generalmente en el mismo operón e inmediatamente contiguas al gen estructural de la bacteriocina (Nes *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003). A este respecto, las proteínas codificadas por los *orf9* y *orf16* podrían actuar como proteínas de inmunidad frente a las bacteriocinas InfC-InfB-InfA e InfE, respectivamente. Por otra parte, existen algunos ejemplos de genes que hipotéticamente codifican proteínas de inmunidad localizados en operones diferentes de aquellos donde se encuentran los genes estructurales de las bacteriocinas, como sucede con *blpY*, *blpX* and *blpL* en *S. pneumoniae* (De Saizieu *et al.*, 2000). En este contexto, se desconoce en este momento frente a qué bacteriocina(s) conferirían inmunidad las proteínas codificadas por *orf10* y *orf11* y las proteínas de inmunidad para InfF e InfG₁-InfG₂ no se encuentran en el mismo operón que los genes estructurales de sus bacteriocinas.

VII.2.2. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DEL CLUSTER GÉNICO DE INFA (INFA₁-INFA₂) DE *S. infantarius* LP90

Con el objeto de determinar qué genes se expresan del *cluster* multibacteriocinogénico en el que se localizan los genes que codifican InfA (InfA₁ e InfA₂) (Fig. 4.2, sección IV.4.1), se llevó a cabo el análisis transcripcional del mismo mediante la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa (RT-PCR). Para ello, teniendo en cuenta que, generalmente, las bacteriocinas son metabolitos primarios resultantes del metabolismo bacteriano generado durante la fase exponencial de crecimiento, se partió de un cultivo de *S. infantarius* LP90

desarrollado en caldo MRS a 37 °C que se encontraba en dicha fase de crecimiento ($DO_{600}=0.8$) para el aislamiento de ARN, el cual se empleó como molde para la síntesis del correspondiente ADN complementario (ADNc) por acción de la transcriptasa inversa. Posteriormente, se emplearon cebadores específicos diseñados en consonancia con la localización de las hipotéticas regiones promotoras y terminadoras de la transcripción identificadas en la secuencia nucleotídica del *cluster* multibacteriocinogénico para la amplificación de distintas regiones. Los resultados obtenidos revelaron que los genes implicados en el transporte de las bacteriocinas y del péptido inductor (región I), así como todos los hipotéticos genes estructurales de bacteriocinas y los que codifican las proteínas de inmunidad (región II), excepto *orf25* y *orf26*, se transcriben bajo las condiciones de crecimiento evaluadas (Fig. 4.3, sección IV.4.2). Los *clusters* bacteriocinogénicos de estreptococos descritos hasta la fecha suelen estar regulados transcripcionalmente mediante un mecanismo basado en la densidad celular conocido como *quorum sensing* (De Saizieu *et al.*, 2000; Van der Ploeg, 2005; Fontaine *et al.*, 2007). En este sistema de regulación, la secreción del péptido inductor desencadena la expresión de todos los genes necesarios para la producción de la bacteriocina a través de su interacción con la proteína histidina-quinasa, que a su vez activa la proteína reguladora de respuesta, que finalmente es la responsable de interaccionar con secuencias específicas situadas en la región promotora de los genes diana (Fontaine *et al.*, 2007). Sin embargo, los genes potencialmente implicados en la regulación de la producción de bacteriocinas en *S. infantarius* LP90 (región III) no se transcribieron a excepción del *orf29*, que codifica un hipotético péptido inductor. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, la producción de estos genes ocurre de forma constitutiva.

VII.2.3. PURIFICACIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS BACTERIOCINAS SECRETADAS POR *S. infantarius* LP90

Dado que los resultados obtenidos del análisis transcripcional descrito en la sección anterior mostraron que, bajo las condiciones ensayadas, se produce la transcripción de todos los genes estructurales de las bacteriocinas presentes en el *cluster* multibacteriocinogénico, se procedió al empleo de diferentes protocolos de purificación que permitieran identificar otros péptidos antimicrobianos secretados por *S. infantarius* LP90, además de InfA₁ (3.963 Da). Concretamente, se emplearon los protocolos: (i) P1, consistente en cromatografías de intercambio catiónico y de fase inversa en un sistema ÄKTA-FPLC; (ii) P2, que incluye cromatografías de intercambio aniónico, de interacción hidrofóbica y de fase inversa, esta última en un sistema ÄKTA-FPLC, y (iii) P3, basado en cromatografías de intercambio catiónico e interacción hidrofóbica. Con el objeto de poder detectar tanto bacteriocinas antineumocócicas como otras carentes de esta actividad, se emplearon como indicadores para la detección de la actividad antimicrobiana de los péptidos purificados *S. pneumoniae* 66405 y *P. damnosus* CECT4797 (una cepa especialmente sensible a la acción de las bacteriocinas). Los resultados obtenidos mediante el protocolo de purificación P1 revelaron la presencia de dos

fracciones (26 y 28) con actividad antimicrobiana (Fig. 4.4, sección IV.4.3.1). En la fracción 26, que únicamente mostró actividad frente a *P. damnosus* CECT4797, se identificó un péptido que, de acuerdo con la masa molecular obtenida en el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF (4.714 Da) (Fig. 4.5A, sección IV.4.3.1), podría corresponder a InfB₂ (4.681 Da). En este contexto, aunque la masa molecular del péptido purificado es aproximadamente 32 Da mayor que la esperada, esta diferencia podría deberse a una modificación espontánea de un residuo de metionina de InfB₂ (Met14) a metionina sulfona (MetSO₂). Además, este análisis reveló la presencia en la misma fracción de otro péptido de masa molecular 3.354 Da, valor muy similar al esperado para InfA₁ (3.357 Da). A este respecto, la masa molecular calculada de la secuencia aminoacídica de InfA₁ codificada por *orf8* (3.357 Da) es, aproximadamente, 600 Da menor que la masa molecular de InfA₁ purificada del sobrenadante de *S. infantarius* LP90 (3.963 Da) (Fig. 3.3, sección III.4.7). Asimismo, conviene destacar que la fracción 26 no mostró actividad antineumocócica, contrastando con la fracción 28 donde se identificó el péptido de 3.963 Da (Tabla IV.3 y Fig. 4.5B, sección IV.4.3.1). La escasa recuperación de actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas tras el empleo del protocolo P1 frente a *P. damnosus* CECT4797 en comparación con la presente originalmente en el sobrenadante frente a esta cepa (11%) (Tabla IV.3, sección IV.4.3.1) sugiere la posibilidad de que en el sobrenadante de *S. infantarius* LP90 se encontraran otros péptidos que no se unieron a la resina catiónica. A este respecto, la falta de carga positiva de InfB₁ (pI 4,37) (Tabla IV.2, sección IV.4.1) en el tampón fosfato sódico (pH 6,0) empleado en este protocolo de purificación podría dificultar la unión de la misma a esta resina. Por lo tanto, la cromatografía de intercambio catiónico fue sustituida por una cromatografía de intercambio aniónico (protocolo P2) con el objeto de recuperar, al menos, este péptido antimicrobiano. El resultado obtenido tras el empleo de este procedimiento reveló la presencia de tres fracciones de 4.718, 3.968 y 4.067 Da (Figs. 4.6 y 4.7, sección IV.4.3.2), que podrían corresponder a InfB₂, InfA₁ modificada e InfG₁ (cuya masa molecular esperada es 4.033 Da), respectivamente, así como dos pequeños picos con masas moleculares de 4.004 y 4.051 Da, que podrían corresponder a InfB₁ (cuya masa molecular esperada es de 4.009 Da) y otra variante de InfG₁, respectivamente. Como sucede con InfB₂, la masa molecular de la primera InfG₁ modificada fue aproximadamente 32 Da mayor que la esperada. En este contexto, considerando que InfG₁ contiene dos residuos de metionina en las posiciones 8 y 17, la masa molecular obtenida (4.067 Da) podría ser el resultado de la conversión de una metionina a MetSO₂ (lo que supone una adición de 32 Da) o de dos residuos de metionina a metionina sulfoxido (MetSO) (adición de 16 Da cada uno). Asimismo, la masa molecular de 4.051 Da identificada también podría corresponder a InfG₁ como resultado de la conversión de un único residuo de metionina a MetSO. Por último, cuando la fracción obtenida tras la cromatografía de intercambio catiónico y de interacción hidrofóbica (protocolo P3) se sometió directamente a espectrometría de masas MALDI-TOF, se observó la presencia de InfA₁ e InfB₂ modificadas, de 3.963 y 4.718 Da, respectivamente (Fig. 4.8, sección IV.4.3.3). Asimismo, también se observaron picos con una masa molecular de 4.031 Da, valor prácticamente idéntico a la masa

molecular esperada de InfG₁ (4.033 Da) y de 3.709 Da, que podría corresponder a InfC₁ (3.702 Da). Aunque los resultados de la espectrometría de masas también revelaron la presencia de otros picos con masas moleculares entre 3-6 kDa en las fracciones analizadas, ninguna de ellas se correspondió con las masas moleculares esperadas del resto de bacteriocinas codificadas en el *cluster* multibacteriocinogénico de *S. infantarius* LP90. Por otra parte, se llevó a cabo un ensayo basado en la técnica CMS a partir de colonias aisladas de un cultivo de *S. infantarius* LP90. Este método permitió la detección de tres picos con masas moleculares de 1.490, 2.246 y 3.966 Da, de los cuales únicamente el último coincide, aproximadamente, con la masa molecular de InfA₁ modificada (3.963 Da). Por último, conviene destacar el intento de identificar los péptidos secretados en un sobrenadante de *S. infantarius* LP90 mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D SDS-PAGE) realizado en el *Departamento de Genética e Biotecnología (Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro, Portugal)*. Esta técnica permite la identificación de proteínas mediante el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de los *spots* extraídos de geles de poliacrilamida-SDS en los que las proteínas se separan en función de su masa molecular una vez que han sido separadas en función de su punto isoeléctrico mediante la técnica de isoelectroenfoque en una etapa anterior. Sin embargo, mediante el empleo de esta técnica no se pudieron identificar ninguno de los péptidos antimicrobianos secretados por *S. infantarius* LP90 (no se muestran los resultados). A este respecto, conviene señalar que, actualmente, no existe ningún estudio que describa el empleo exitoso de dicha técnica para la identificación de las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes de las cepas productoras.

En resumen, los protocolos de purificación empleados en este trabajo (P1, P2 y P3) permitieron la identificación de cinco de los doce hipotéticos péptidos antimicrobianos codificados en el *cluster* multibacteriocinogénico de *S. infantarius* LP90 (InfA₁, InfB₁, InfB₂, InfC₁ and InfG₁). Asimismo, los resultados obtenidos de CMS y 2D SDS-PAGE revelaron que el empleo de protocolos multicromatográficos basados en el pequeño tamaño molecular, carga iónica y relativa hidrofobicidad de los péptidos antimicrobianos es fundamental para poder identificar con éxito el mayor número de los péptidos secretados por *S. infantarius* LP90. Conviene destacar que InfA₁, InfB₁, InfB₂, InfC₁ and InfG₁ ejercen actividad antimicrobiana frente a *P. damnosus* CECT4797, mientras que InfA₁ modificada (3.963 Da) también posee actividad antineumocócica. Los resultados obtenidos sugieren que los protocolos más eficaces para la identificación de las bacteriocinas secretadas por *S. infantarius* LP90 son los protocolos P2 y P3, pues permitieron la identificación de cuatro péptidos antimicrobianos: el péptido aniónico InfB₁, así como InfA₁, InfB₂ e InfG₁ modificadas e InfC₁ e InfG₁, y InfA₁ e InfB₂ modificadas, respectivamente. Sin embargo, estos resultados no permiten descartar la posibilidad de que *S. infantarius* LP90 secrete otras bacteriocinas, como de hecho sugieren los resultados del análisis transcripcional del *cluster* multibacteriocinogénico. En este contexto, la baja recuperación de la actividad antimicrobiana presente inicialmente en el sobrenadante tras la purificación de InfA₁, InfB₂ y InfG₁ modificadas sugiere que estos péptidos antimicrobianos son

producidos a niveles muy bajos, lo que podría dificultar su recuperación. En este sentido, conviene señalar que la purificación de bacteriocinas está sujeta a varias limitaciones (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Así, por ejemplo, el desarrollo de *S. infantarius* LP90 en caldo MRS, un medio de cultivo complejo constituido por una gran variedad de péptidos con masas moleculares incluidas en el rango de la mayoría de las bacteriocinas (3-6 kDa), podría dificultar la purificación de las bacteriocinas (Yang y Ray, 1994; Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Asimismo, debido a la naturaleza heterogénea de las bacteriocinas, estandarizar el método de purificación es muy complicado, especialmente cuando una cepa produce un elevado número de péptidos antimicrobianos simultáneamente. Por otra parte, existe la posibilidad de que no todas las bacteriocinas codificadas hipotéticamente por *S. infantarius* LP90 se produzcan, a pesar de que sus correspondientes genes estructurales se transcriban. Asimismo, algunas bacteriocinas podrían haber sufrido modificaciones que dificultarían su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los resultados obtenidos de los análisis realizados revelan que *S. infantarius* LP90 produce dos variantes de InfA₁ (3.963 y 3.357 Da). Por una parte, InfA₁ modificada (3.963 Da) ejerce actividad antineumocócica y presenta una masa molecular que no coincide con la esperada (3.357 Da); por otra parte, InfA₁ con la masa molecular esperada (3.357 Da) no presenta actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae*. A este respecto, se proponen tres hipótesis para explicar estas observaciones: (i) InfA₁ (3.963 Da) estaría modificada o unida a una molécula desconocida que le conferiría actividad antineumocócica; en este contexto, la comparación de los resultados obtenidos tras la digestión con tripsina y huella peptídica de InfA₁ modificada (3.963 Da) e InfA₁ sintetizada químicamente (InfA_{1-S}, sección VI.3.3) (no se muestran los resultados) no permitió identificar la naturaleza de la modificación de la primera; (ii) la cantidad de InfA₁ (3.357 Da) producida por *S. infantarius* LP90 sería insuficiente para inhibir el crecimiento de *S. pneumoniae*, mientras que la existencia de una mayor cantidad de InfA₁ modificada (3.963 Da) permitiría detectar su actividad antineumocócica (en este caso, la modificación de InfA₁ no estaría implicada en la actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae*), y (iii) dado que InfA₁ e InfA₂ constituyen un sistema de dos péptidos (secciones V.4.2 y V.4.4), InfA₂ podría estar presente en la misma fracción que InfA₁ (3.963 Da) en la cantidad necesaria para ejercer actividad antineumocócica sinérgica, pero no para ser detectada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Además, al igual que sucede con InfA₁ (3.963 Da), InfA₂ podría presentar una masa molecular modificada, lo que dificultaría su identificación en esta fracción.

VII.3. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE INFA₁ E INFA₂ POR *Pc. pastoris* Y *L. lactis*

La rápida emergencia a nivel mundial de poblaciones bacterianas resistentes a numerosos antibióticos en especies con un elevado potencial patogénico, entre las que destaca *S. pneumoniae*, ha estimulado el interés por el desarrollo de nuevos compuestos que proporcionen una protección más eficaz frente a las infecciones bacterianas y que puedan ser

empleados en el ámbito clínico. En este sentido, como se ha mencionado anteriormente, las bacteriocinas producidas por BAL se proponen como estrategia terapéutica alternativa o complementaria a los antibióticos tradicionales (Cotter *et al.*, 2013). No obstante, para que las bacteriocinas puedan emplearse de forma generalizada en el ámbito clínico, es necesario disponer de sistemas que posibiliten su producción a escala industrial. A este respecto, el alto coste de producción y los bajos rendimientos obtenidos en los procesos de purificación de estos péptidos a partir de la cepa productora salvaje (Khan *et al.*, 2010) hacen necesaria la búsqueda de sistemas alternativos para su producción. En este contexto, los sistemas de producción heterólogos, incluyendo levaduras y BAL, podrían ofrecer mejores resultados (Lohans and Vederas, 2012). Además, la producción de las bacteriocinas por hospedadores heterólogos permitiría: (i) su producción por hospedadores más seguros; (ii) disponer de cepas productoras de varias bacteriocinas, y (iii) dotar de una actividad antimicrobiana mayor o más específica a las bacterias lácticas utilizadas como cultivos protectores o probióticos (Gutiérrez, 2005; Criado, 2006; Martín, 2006; Basanta, 2007; Sánchez, 2008).

La cepa multibacteriocinogénica *S. infantarius* LP90 presenta un amplio y potente espectro de acción antineumocócico debido a la producción de InfA₁ modificada (3.963 Da) y/o a la acción combinada de InfA₁ e InfA₂ (InfA). A este respecto, en este trabajo se evaluó el empleo de *Pc. pastoris* y *L. lactis* subesp. *cremoris* como sistemas heterólogos para la producción de InfA₁ e InfA₂ con el objeto de confirmar el efecto antineumocócico sinérgico ejercido por ambos péptidos, así como determinar si ambos hospedadores constituyen una alternativa eficaz para su producción.

VII.3.1.EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE INFA₁ E INFA₂ POR *Pc. pastoris*

Las levaduras, entre las que se incluye *Pc. pastoris*, han sido empleadas con éxito en la producción de una gran variedad de péptidos y proteínas heterólogas (Gellissen *et al.*, 2005; Böer *et al.*, 2007). *Pc. pastoris* es una levadura metilotrófica utilizada muy frecuentemente como modelo para el desarrollo de sistemas de producción heteróloga de proteínas debido a: (i) la simplicidad de las técnicas para su manipulación genética; (ii) su capacidad para producir, intracelular y extracelularmente, grandes cantidades de proteínas recombinantes; (iii) su competencia para llevar a cabo modificaciones postraduccionales en las proteínas (*e.g.* glicosilaciones, formación de enlaces disulfuro y maduración proteolítica), y (iv) la disponibilidad de sistemas de expresión heteróloga comerciales para este hospedador (Cereghino y Cregg, 1999, 2000; Ilgen *et al.*, 2005; Sebban-Kreuzer *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Además, el empleo de *Pc. pastoris* como hospedador heterólogo generalmente permite la posterior adaptación de los ensayos de laboratorio a las condiciones industriales (Cregg *et al.*, 1993; Cereghino y Cregg, 2000). En el contexto de las bacteriocinas, *Pc. pastoris* ha sido empleada en la producción heteróloga de EntP de *E. faecium* P13 (Gutiérrez *et al.*, 2005a), PedPA-1 de *P. acidilactici* PAC1.0 (Beaulieu *et al.*, 2005), HirJM79 de *E. hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2008), EntL50 (EntL50A y EntL50B) de *E. faecium* L50 (Basanta *et al.*, 2010)

y EntA de *E. faecium* T136 (Borrero *et al.*, 2012). En todos los casos, excepto en el de las cepas diseñadas para la producción heteróloga de PedPA-1, se identificaron bacteriocinas con actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de las cepas recombinantes de *Pc. pastoris*. En este trabajo, se empleó el vector de expresión y secreción de *Pc. pastoris* pPICZαA (3.593 pb) (Fig. 5.1, sección V.3.4.1) que contiene las regiones: (i) *MFα1s*, que permite la secreción de las proteínas recombinantes a través del sistema Sec; (ii) *P_{AOX1}*, un promotor inducible por metanol que permite la sobreexpresión de los genes que se encuentran bajo su control, y (iii) *AOX1*, secuencia nucleotídica que facilita la integración del vector linearizado en el genoma de *Pc. pastoris*, incrementa la estabilidad de las proteínas recombinantes y permite la construcción de cepas con varias copias del gen recombinante (Brake *et al.*, 1984; Cregg *et al.*, 1993; Cereghino y Cregg, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005a). Conviene destacar que el promotor *P_{AOX1}* es responsable de la sobreexpresión de *AOX1* y, con ello, de la producción de cantidades de AOX que constituyen más del 30% de la proteína total soluble (Cereghino y Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). Por otra parte, *MFα1s* es el péptido señal (SP) más utilizado para la secreción heteróloga de proteínas en este hospedador debido a que su efectividad es mayor que la de los SP de las correspondientes proteínas (Cereghino y Cregg, 2000), especialmente en el caso de las de pequeño tamaño molecular (Sreekrishna *et al.*, 1997). A este respecto, las regiones nucleotídicas de *infA₁* e *infA₂* que codifican InfA₁ e InfA₂ maduras, respectivamente, fusionadas con *MFα1s* se clonaron en el vector pPICZαA, obteniéndose los plásmidos recombinantes pPIA₁ and pPIA₂, respectivamente (Fig. 5.1, sección V.3.4.1), que se transformaron en células competentes de *Pc. pastoris*, lo que permitió la obtención de las levaduras recombinantes *Pc. pastoris* X-33-A₁ (pPIA₁) y *Pc. pastoris* X-33-A₂ (pPIA₂), respectivamente. Dado que ninguna de las colonias de las cepas recombinantes ensayadas mostró actividad antimicrobiana tras su crecimiento en medio sólido BMMY, se procedió a la selección de colonias de las cepas recombinantes *Pc. pastoris* X-33-A₁ y *Pc. pastoris* X-33-A₂ con base en su elevada resistencia a la zeocina (3.000 y 2.000 µg/ml, respectivamente). En este sentido, se ha observado que las cepas que presentan altos niveles de resistencia a la zeocina son capaces de llevar a cabo una mayor expresión de la proteína recombinante debido a la integración de múltiples copias del ADN heterólogo en sus genomas (Cereghino and Gregg, 2000; Apte-Deshpnade *et al.*, 2009; Basanta *et al.*, 2010). Con el objeto de determinar si las levaduras recombinantes seleccionadas eran capaces de producir InfA₁ e InfA₂, se obtuvieron los sobrenadantes libres de células de un cultivo de *Pc. pastoris* X-33-A₁ y *Pc. pastoris* X-33-A₂, respectivamente, desarrolladas en BMMY a 30° C durante 24, 48, 72 y 96 horas tras la inducción con metanol. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae* 66405 y *P. damnosus* CECT4797. No obstante, cuando se llevó a cabo un proceso de purificación de los péptidos hipotéticamente presentes en los sobrenadantes de las cepas recombinantes obtenidos 24, 48, 72 y 96 h tras la inducción con metanol sí se detectó actividad antimicrobiana. A este respecto, en ambas cepas recombinantes, las primeras fracciones que mostraron actividad antimicrobiana frente a *P. damnosus*

CECT4797 fueron las resultantes de la cromatografía de interacción hidrofóbica y esta actividad fue máxima a las 72 h tras la inducción con metanol (Fig. 5.3, sección V.4.2). Estos resultados sugieren que podrían ser necesarios periodos de incubación largos para alcanzar la máxima producción de bacteriocina, como describieron Basanta *et al.* (2009) en cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* productoras de EntL50 (EntL50A y EntL50B). Por otra parte, ninguna de las fracciones analizadas presentó actividad frente a *S. pneumoniae*. Sin embargo, cuando las fracciones obtenidas tras las cromatografías de interacción hidrofóbica de los procesos de purificación de los péptidos presentes en los sobrenadantes obtenidos tras 72 h de crecimiento de ambas levaduras recombinantes se combinaron en proporción 1:1, sí se observó la inhibición del crecimiento de *S. pneumoniae* 66405 (Fig. 5.4, sección V.4.2). Este resultado puso de manifiesto la producción de InfA₁ e InfA₂ por *Pc. pastoris* X-33-A₁ y *Pc. pastoris* X-33-A₂, respectivamente, y confirmó que ambos péptidos constituyen el sistema de dos péptidos (subclase IIb) (sección II.2.2.1) denominado InfA. A este respecto, InfA se incluiría dentro de los sistemas de dos péptidos en los que es necesaria la presencia simultánea de ambos para que la bacteriocina sea activa (*e.g.* lactococcina G [(α y β)], a diferencia de los sistemas en los que uno o ambos péptidos son activos independientemente, pero muestran una actividad mayor en presencia del otro péptido (*e.g.* termofilina 13 [ThmA y ThmB] y enterocina L50 [L50A y L50B], respectivamente) (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Marciset *et al.*, 1997 y Cintas *et al.*, 1998). No obstante, el hecho de que InfA₁ e InfA₂ presenten actividad frente a *P. damnosus* CECT4797 individualmente, sugiere que el requerimiento de que ambos péptidos se encuentren presentes para ejercer actividad antimicrobiana podría depender de la sensibilidad del microorganismo empleado como indicador de dicha actividad.

VII.3.2.EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE INFA₁ E INFA₂ POR *L. lactis* subesp. *cremoris*

Las BAL también se presentan como hospedadores adecuados para la producción heteróloga de péptidos y proteínas, ya que la mayoría de las especies que pertenecen a este grupo han sido reconocidas con el estatus QPS por la EFSA (EFSA, 2005a, 2005b; EFSA, 2007; EFSA, 2011; EFSA, 2014). Las BAL son microorganismos Gram-positivos cuyas proteínas de secreción son liberadas al medio exocelular mediante el sistema Sec o por sistemas de transporte dedicados del tipo ABC, facilitando y reduciendo los costes de la purificación de la proteína en comparación con los sistemas de expresión intracelular (Gómez-Sala, 2013). Algunas especies pertenecientes al grupo de las BAL, como *L. lactis*, son una alternativa atractiva para la producción heteróloga de proteínas. En este contexto, esta especie se caracteriza por: (i) su seguridad, siendo un microorganismo incluido en la lista QPS que se emplea consistentemente en procesos de fermentación en la industria alimentaria, y (ii) la secreción de un número muy reducido de proteínas, lo que facilitaría la purificación de la proteína de interés (Bahey-El-Din *et al.*, 2010). Estudios previos han demostrado la eficacia de *L. lactis* como hospedador para la secreción de bacteriocinas maduras dirigidas por SP

heterólogos (Herranz y Driessen, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007a, 2007b; Borrero *et al.*, 2011a, 2011b; Gómez-Sala, 2013). A este respecto, con el objeto de evaluar la producción heteróloga de InfA₁ e InfA₂ por *L. lactis*, se procedió a la construcción de quimeras génicas en las que la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder del tipo doble glicina de ambos péptidos se reemplazó por la del SP de la proteína Sec-dependiente Usp45 (SP_{usp45}), que constituye la principal proteína secretada por *L. lactis*. Con base en los estudios acerca de la actividad protectora de las proteínas de inmunidad sobre las células productoras de bacteriocinas (Diep *et al.*, 2007; Kjos *et al.*, 2010), en primer lugar se procedió a la clonación de los tres genes que codifican hipotéticas proteínas de inmunidad localizados de forma contigua a los genes de InfA₁ e InfA₂ (*orf9*, *orf10* y *orf11*) en el vector de expresión constitutivo pMG36c, generándose el plásmido pMI (Fig. 5.2, sección V.3.5.2). A continuación, las quimeras génicas de InfA₁ e InfA₂ (SP_{usp45}-InfA₁ y SP_{usp45}-InfA₂) se clonaron de forma separada y conjunta en el vector pMI, generándose los plásmidos recombinantes pMIA₁, pMIA₂ y pMIA_{1A2} (Fig. 5.2, sección V.3.5.2). Posteriormente, estos plásmidos se transformaron en células competentes de *L. lactis* subesp. *cremoris* NZ9000, obteniéndose de este modo las cepas recombinantes *L. lactis* NZ9000-IA₁ (pMIA₁), *L. lactis* NZ9000-IA₂ (pMIA₂) y *L. lactis* NZ9000-IA_{1A2} (pMIA_{1A2}) capaces potencialmente de producir y secretar InfA₁, InfA₂ o ambos péptidos, respectivamente. Sin embargo, al igual que sucedió cuando se empleó *Pc. Pastoris* como hospedador heterólogo, ninguna de las cepas recombinantes mostró actividad antimicrobiana tras su crecimiento en medio sólido SGM17, por lo que la selección de las colonias recombinantes se llevó a cabo al azar tras confirmarse la correcta secuencia nucleotídica de sus plásmidos. A continuación, con el objeto de determinar si las colonias de las cepas recombinantes de *L. lactis* NZ9000 seleccionadas producían InfA₁ y/o InfA₂, se obtuvieron los sobrenadantes de cultivos de *L. lactis* NZ9000-IA₁, *L. lactis* NZ9000-IA₂ y *L. lactis* NZ9000-IA_{1A2} desarrollados en caldo GM17 a 30 °C durante 16 h. Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de estos sobrenadantes mostraron la ausencia de actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae* 66405 y *P. damnosus* CECT4797. Con base en los resultados obtenidos en *Pc. pastoris*, se procedió a la purificación de los péptidos presentes en los sobrenadantes de las cepas recombinantes, lo que permitió la detección de actividad antimicrobiana. A este respecto, las primeras fracciones con actividad antimicrobiana frente a *P. damnosus* CECT4797 se obtuvieron tras la cromatografía de intercambio catiónico en las cepas recombinantes *L. lactis* NZ9000-IA₁ y *L. lactis* NZ9000-IA₂ y tras la cromatografía de filtración en gel en *L. lactis* NZ9000-IA_{1A2}. Sin embargo, ninguna de las fracciones obtenidas de *L. lactis* NZ9000-IA₁ y *L. lactis* NZ9000-IA₂ presentó actividad antimicrobiana frente a *S. pneumoniae*, a diferencia de las fracciones obtenidas a partir de *L. lactis* NZ9000-IA_{1A2} que mostraron actividad antineumocócica a partir de la cromatografía de filtración en gel (Tablas V.3, V.4 y V.5, sección V.4.4).

Los resultados del análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de los péptidos purificados de las cepas recombinantes de *L. lactis* NZ9000 no permitió detectar en ningún caso

péptidos con las masas moleculares esperadas de InfA₁ e InfA₂ (3.357 y 3.000 Da, respectivamente). El análisis de la fracción A1-17, obtenida a partir del sobrenadante de *L. lactis* NZ9000-IA₁, mostró que contenía un pico con una masa molecular de 3.211 Da, lo que representa un tamaño 146 Da menor del esperado para InfA₁ (Fig. 5.9B, sección V.4.4). Por otra parte, el análisis de las dos fracciones (A2-13 y A2-14) obtenidas a partir de un sobrenadante de *L. lactis* NZ9000-IA₂ reveló la presencia de un pico principal con una masa molecular 376 Da mayor de la esperada para InfA₂ (Fig. 5.10, sección V.4.4). Asimismo, el análisis de las fracciones obtenidas a partir de *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂ mostró la presencia de un número elevado de picos, de los que los más destacados presentaron masas moleculares de 2.708 y 2.924 Da (A1A2-9) y de 3.024 Da (A1A2-14), ninguna de las cuales coincide con las esperadas para estos péptidos (Fig. 5.11, sección V.4.4). Sin embargo, la combinación en proporción 1:1 de las fracciones A1-15 y A2-14, obtenidas de *L. lactis* NZ9000-IA₁ y *L. lactis* NZ9000-IA₂, respectivamente, resultó en la inhibición del crecimiento de *S. pneumoniae* 66405 (Fig. 5.7, sección V.4.4). Asimismo, las fracciones purificadas a partir de *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂, que hipotéticamente produce ambos péptidos en concentraciones equimolares, también mostraron actividad antineumocócica (Tabla V.5, sección V.4.4). Por lo tanto, las cepas recombinantes parecen producir ambos péptidos, aunque de acuerdo con los resultados de la espectrometría de masas, de una forma modificada, lo que, en cualquier caso, no les impide ejercer su actividad antimicrobiana. Estas modificaciones podrían deberse a un procesamiento incorrecto del precursor de las bacteriocinas, lo que daría lugar a péptidos con masas moleculares mayores o menores de las esperadas. En este sentido, varios factores incluyendo el balance de carga, el perfil hidrofóbico y las interacciones entre las regiones N-, H- y C- del SP pueden influir en el procesamiento de los péptidos (Ng y Sarkar, 2013). Por otra parte, los péptidos con mayor masa molecular de la esperada podrían estar unidos a componentes desconocidos procedentes del medio, como parece suceder con la InfA₁ (3.963 Da) (Capítulo IV).

Finalmente, conviene recordar que los hospedadores heterólogos deberían ser capaces de mejorar la producción y aumentar la actividad antimicrobiana específica de los péptidos recombinantes con respecto a la cepa salvaje. En este sentido, el incremento de la actividad antineumocócica específica mostrada por las fracciones A1A2-9 y A1A2-14 purificadas de *L. lactis* NZ9000-IA₁A₂ fue aproximadamente 20 veces menor que la obtenida tras la purificación de la InfA₁ producida por *S. infantarius* LP90 (Tabla III.9, sección III.4.7). Por lo tanto, aunque las fracciones A1A2-9 y A1A2-14 mostraron actividad antineumocócica, varios factores deben ser optimizados para mejorar la eficiencia de la producción heteróloga de InfA₁ e InfA₂ en este hospedador heterólogo.

VII.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE INFA (INFA₁-INFA₂) FRENTE A *S. pneumoniae* EN CALDO DE CULTIVO, SALIVA HUMANA Y UN SISTEMA MODELO DE *BIOFILM*

Como ya se ha mencionado anteriormente, *S. pneumoniae* es uno de los patógenos más importantes para el ser humano. Este microorganismo constituye el principal agente etiológico de enfermedades tales como la otitis media, la sinusitis y la neumonía, así como de importantes infecciones invasivas, como la bacteriemia y la meningitis, caracterizadas por una elevada morbilidad y mortalidad, tanto en países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo. El desarrollo de vacunas frente a este patógeno constituye una estrategia de control fundamental para paliar la problemática de la propagación de las cepas más virulentas. Sin embargo, diversos estudios señalan como principal limitación de la misma el aumento paralelo de aislados clínicos pertenecientes a serotipos no incluidos en las vacunas, que habrían pasado a ocupar el nicho ecológico de los desplazados por la aplicación de las mismas (Rodgers *et al.*, 2009; Schuerman *et al.*, 2009). En consecuencia, la antibioterapia constituye actualmente una estrategia complementaria a la vacunación de gran relevancia para el abordaje de la problemática relacionada con *S. pneumoniae*. Sin embargo, el tratamiento antibiótico suele ir asociado a la aparición de disbiosis y su empleo inadecuado ha provocado la diseminación de poblaciones bacterianas multirresistentes (resistencia a tres o más familias de antibióticos), lo cual representa un importante problema de salud pública. En este contexto, actualmente resulta imprescindible el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para abordar la problemática de las infecciones producidas por *S. pneumoniae*, entre las que destaca la otitis media (OM). La OM constituye la causa principal de las consultas infantiles en centros de atención primaria, así como de prescripción de antibióticos en niños. El uso frecuente de antimicrobianos en este grupo poblacional, considerado el principal reservorio de este microorganismo y, por lo tanto, la principal fuente de contagio para los adultos, está conduciendo a: (i) un incremento de aparición de resistencias (McCullers *et al.*, 2007) y (ii) la reducción de la presencia de bacterias beneficiosas que actúan como barrera evitando la colonización y/o crecimiento de microorganismos patógenos (Lund *et al.*, 2001; Brook y Gober, 2009). En este contexto, las bacteriocinas producidas por BAL podrían constituir una estrategia alternativa o complementaria a la antibioterapia tradicional (Cotter *et al.*, 2013). Sin embargo, para la introducción de un nuevo agente antimicrobiano en la práctica clínica es necesaria una evaluación exhaustiva del agente propuesto. En este contexto, se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana de InfA (InfA₁-InfA₂) frente a *S. pneumoniae* desarrollado en caldo de cultivo, saliva humana y un modelo de *biofilm* para determinar su potencial terapéutico como agente antimicrobiano complementario a los antibióticos en el control de las infecciones neumocócicas en humanos.

VII.4.1. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEUMOCÓCICA DE INF_{A1} (3.963 Da) E INF_{A1} E INF_{A2} SINTETIZADAS QUÍMICAMENTE

Debido a la complejidad del proceso de purificación de Inf_{A1} e Inf_{A2} de los sobrenadantes de *S. infantarius* LP90, así como al bajo rendimiento obtenido mediante el empleo de los sistemas de producción heteróloga (Capítulo V), se procedió a la síntesis química de ambos péptidos (Inf_{A1-S} e Inf_{A2-S}), lo que permitió obtener cantidades suficientes de los mismos para realizar los ensayos requeridos. La determinación de la CMI de Inf_{A1} (3.963 Da) purificada de los sobrenadantes de la cepa salvaje *S. infantarius* LP90 (Inf_{A1-P}) mediante el procedimiento descrito en el Capítulo III (sección III.3.8) y de Inf_{A1-S} e Inf_{A2-S}, evaluadas de forma independiente y combinada en diferentes proporciones (2:1, 1:1 y 1:2), frente a *S. pneumoniae* 66405 reveló que, aunque estos péptidos no ejercen actividad antineumocócica de forma individual, la utilización combinada de ambos péptidos ejerce un efecto sinérgico inhibitor frente a este patógeno.

En lo que respecta a las diferentes ratios empleadas, la CMI de la combinación de Inf_{A1-S} e Inf_{A2-S} en proporción 1:2 (11,9 mg/ml) fue prácticamente el doble de la obtenida de las combinaciones de estos péptidos en proporción 2:1 y 1:1 (5,9 mg/ml), lo que puso de manifiesto que es necesario combinar Inf_{A1-S} e Inf_{A2-S} en cantidades equimolares o con una mayor proporción de Inf_{A1-S} que de Inf_{A2-S} para conseguir la menor CMI frente a *S. pneumoniae*. Por otra parte, conviene destacar que las combinaciones de estos péptidos en proporción 2:1 y 1:1, y 1:2 resultaron en CMI 3,3 y 1,6 veces inferiores, respectivamente, a la de Inf_{A1-P} (19,8 mg/ml), poniendo de manifiesto la mayor potencia de Inf_{A_S} (Inf_{A1-S}-Inf_{A2-S}) que de Inf_{A1-P} para inhibir el crecimiento de *S. pneumoniae* 66405 (Tabla VI.1, sección VI.4.1).

VII.4.2. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE UN SOBRENADANTE CONCENTRADO DE *S. infantarius* LP90, INF_{A1-P} E INF_{A1-S} Y/O INF_{A2-S} FRENTE A *S. pneumoniae* EN CALDO DE CULTIVO

Con el objeto de determinar el mecanismo de acción (bactericida o bacteriostático) mediante el que los péptidos antimicrobianos secretados por *S. infantarius* LP90 ejercen su acción antineumocócica, cultivos de *S. pneumoniae* 66405 (1×10^5 ufc/ml) se trataron con: (i) 500 µl de un sobrenadante concentrado veinte veces (20×CS) de *S. infantarius* LP90, (ii) 5 µM de Inf_{A1-P} (correspondiente a 1× CMI), (iii) 0,937 µM de Inf_{A1-S} o Inf_{A2-S} y (iv) 0,937 µM de Inf_{A_S} (Inf_{A1-S}-Inf_{A2-S}; ratio 1:1) (correspondiente a 1× CMI). Los resultados obtenidos revelaron que el 20×CS de *S. infantarius* LP90 ejerce un efecto bactericida sobre *S. pneumoniae* 66405 caracterizado por una disminución de 3 log en el número de células viables durante la primera hora de tratamiento y de 5 log a partir de la segunda hora. Sin embargo, la exposición a Inf_{A1-P} resultó en un efecto bacteriostático. A este respecto, conviene recordar que, como se describió en el Capítulo IV, bajo las condiciones de crecimiento empleadas en este trabajo *S. infantarius* LP90 produce, además de Inf_{A1} (3.963 Da), los péptidos antimicrobianos InfB₁,

InfB₂, InfC₁ y InfG₁. Por lo tanto, el efecto bactericida mostrado por el 20×CS, en contraste con el efecto bacteriostático ejercido por InfA_{1-P}, podría deberse: (i) al efecto sinérgico de los péptidos presentes en el sobrenadante y/o (ii) a que InfA₁ esté presente en el sobrenadante a una concentración mayor que la evaluada en el ensayo (5 µM). Por otra parte, el tratamiento con InfA_{1-S} o InfA_{2-S} resultó en un crecimiento similar al obtenido en la muestra control (cultivo de *S. pneumoniae* 66405 sin adición de ningún péptido), lo que confirma nuevamente la ineficacia de ambos péptidos en la inhibición de este patógeno cuando son empleados de forma independiente. Finalmente, InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; ratio 1:1) ejerció un efecto bactericida caracterizado por una drástica caída en el número de células viables (>5 log) desde el inicio hasta el final del tratamiento (Fig. 6.2, sección VI.4.2). Conviene destacar que los tratamientos con el 20×CS e InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; ratio 1:1) resultaron en un efecto bactericida similar, caracterizado por una rápida y persistente reducción del número de células viables de *S. pneumoniae*, lo que apoyaría la hipótesis de la producción de InfA₂ por *S. infantarius* LP90 a pesar de no detectarse en las fracciones resultantes de los distintos procesos de purificación empleados (Capítulo IV).

VII.4.3. EFECTO DE INFAS SOBRE LA FORMACIÓN *IN VITRO* DE BIOFILMS POR *S. pneumoniae*

El crecimiento de los microorganismos en forma de *biofilms* o biopelículas se ha relacionado con un 80% de las infecciones crónicas y con la necesidad de aumentar la dosis del antimicrobiano en el tratamiento de estos procesos (Domenech *et al.*, 2011). Este tipo de crecimiento es común en los neumococos que colonizan la nasofaringe y se ha observado su presencia en otitis crónicas de niños (Moscoso *et al.*, 2009). En este contexto, en este trabajo se determinó la capacidad de diferentes concentraciones de InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; ratio 1:1) (50 a 2 µM) para prevenir la formación de *biofilms in vitro* por *S. pneumoniae*, así como su efecto sobre *biofilms* ya desarrollados. Los resultados obtenidos revelaron una disminución del número de células viables (1,5 log) obtenidas de *biofilms* desarrollados en presencia de 50, 25 y 12,5 µM de InfA_S, así como la ausencia o disminución de su actividad α-hemolítica (Figs. 6.3 y 6.4, respectivamente, sección VI.4.3). Estos resultados revelan que InfA_S ejerce un efecto bactericida inicial seguido de un efecto bacteriostático en la formación de *biofilms* neumocócicos. Por otra parte, el efecto de esta bacteriocina sobre *biofilms* previamente desarrollados durante 24 h fue menor, mostrando una reducción del número de células viables entre 1,3 y 1,2 log (Fig. 6.3, sección VI.4.3). Con base en los resultados obtenidos, cabe destacar que, en ambos casos, el efecto antineumocócico de InfA_S es considerablemente menor que el observado en caldo de cultivo (> 5 log a la concentración de 0.937 µM). En este contexto, diversos estudios han mostrado un incremento de 10-1.000 veces en la tolerancia frente a antimicrobianos de *biofilms* en comparación con el mismo microorganismo en estado planctónico (Davies, 2003). Entre las hipótesis propuestas para explicar este fenómeno se incluyen: (i) la transición hacia un estado sésil favorecida por la acumulación de productos de desecho en el *biofilm* y (ii) que una subpoblación de bacterias entrara en un estado fenotípico

altamente protegido similar al de las esporas (Stewart y Costerton, 2001). Además, la menor eficacia de los antimicrobianos sobre las células bacterianas que conforman el *biofilm* podría deberse a que la matriz extracelular de sustancias poliméricas imposibilitara el acceso del antimicrobiano a las células (Domenech *et al.*, 2011). En este sentido, existen algunos agentes que podrían emplearse en combinación con las bacteriocinas con el objeto de mejorar su efecto antimicrobiano sobre los *biofilms*. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el complejo lipoproteico conocido como HAMLET (del inglés, *Human Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells*) presente de forma natural en la leche materna resulta altamente efectivo en combinación con antibióticos para la erradicación de *biofilms* neumocócicos desarrollados *in vitro* (Marks *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado la utilidad de hidrolasas de la pared celular de *S. pneumoniae* o sus fagos para la eliminación de *biofilms* de este patógeno (Domenech *et al.*, 2011).

VII.4.4. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD FUNCIONAL Y DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE INFAS FRENTE A *S. pneumoniae* EN SALIVA HUMANA

El empleo potencial de bacteriocinas en el tratamiento de infecciones de relevancia clínica es un tema de máximo interés. A este respecto, NisA, lantibiótico producido por varias cepas de *L. lactis*, así como las salivaricinas A y B producidas por *S. salivarius* 20P3 y *S. salivarius* K12, respectivamente, han sido evaluadas en diversos estudios con el objeto de emplearlas en el tratamiento de determinadas infecciones humanas (Goldstein *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003; Chilcott y Tagg, 2005; Cotter *et al.*, 2005a; Tagg, 2004; Tagg *et al.*, 2006; Gillor y Ghazaryan, 2007). Conviene mencionar que para que las bacteriocinas puedan emplearse eficazmente como agentes terapéuticos deben cumplir requerimientos específicos, entre los que se incluyen: (i) ser activas frente al patógeno deseado y (ii) ser estables en el medio donde deban ejercer su actividad antimicrobiana (Gillor *et al.*, 2005). En este contexto, con el fin de evaluar la posible utilidad de la administración por vía oral de InfAS (InfA_{1-S} e InfA_{2-S}) para el control de las infecciones neumocócicas se procedió a evaluar su estabilidad funcional en saliva humana. Los resultados obtenidos revelaron que InfAS (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; ratio 1:1; 50µM) conserva el 90% de su actividad antineumocócica original tras su incubación en saliva humana a 37 °C durante 8 h (Fig. 6.5, sección VI.4.4), lo que pone de manifiesto que este fluido biológico no ejerce un impacto negativo sobre la actividad antimicrobiana de esta bacteriocina.

A continuación, con el objeto de determinar el mecanismo de acción de InfAS frente a *S. pneumoniae* 66405 en una muestra de saliva humana, se evaluaron distintas concentraciones de esta bacteriocina (0,937 a 7,5 µM) en este fluido biológico. A pesar de que, como se ha mencionado anteriormente, la saliva no influye negativamente en la actividad antineumocócica de InfAS, los resultados obtenidos en este ensayo revelaron que es necesaria una concentración mucho mayor de InfAS (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; ratio 1:1) para obtener el mismo efecto bactericida (> 5 log) que el conseguido en caldo de cultivo (7,5 vs. 0,937 µM, respectivamente) (Fig. 6.6, sección VI.4.5). Esta observación contrasta con la hipótesis sobre la existencia de un posible

efecto sinérgico entre las bacteriocinas y las enzimas antimicrobianas presentes en la saliva (Dobson *et al.*, 2011). En cualquier caso, aunque actualmente se desconoce el motivo de la menor actividad antimicrobiana de InfA_S en este medio, este hecho no parece estar relacionado con la presencia de amilasa ni con el pH de la saliva humana (6,5-7,4 en condiciones fisiológicas), como sugieren los resultados que demuestran la estabilidad de la bacteriocina tras el tratamiento con esta enzima y bajo diversos valores de pH (Capítulo III, sección III.4.4).

VII.4.5. EFECTO DE INFAS SOBRE LA MICROBIOTA DE LA SALIVA

Entre los efectos secundarios más preocupantes asociados al empleo de antibióticos se encuentra la inducción de cambios en la microbiota comensal y la generación de poblaciones bacterianas resistentes. En este sentido, conviene destacar que en niños con otitis recurrentes, la utilización repetida de antimicrobianos favorece la emergencia de cepas resistentes a los mismos y, al mismo tiempo, se reduce la población de bacterias beneficiosas (Lazarevic *et al.*, 2013). Por este motivo, y con base en la posible administración por vía oral de InfA_S para el control de las infecciones neumocócicas, se procedió a la evaluación del efecto de InfA_S (InfA_{1-S} and InfA_{2-S}) sobre la microbiota anaeróbica de la saliva humana. Para ello, se añadió InfA_S (InfA_{1-S}- InfA_{2-S}; ratio 1:1; 50 µM) a una muestra de saliva humana y se incubó la mezcla a 37 °C durante 10, 30 y 60 min. Posteriormente se procedió al recuento de la microbiota presente en la saliva, así como a la secuenciación de 10 colonias escogidas al azar de cada una de las muestras previa amplificación del gen que codifica la enzima superóxido dismutasa (gen *sodA*) (Poyart *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos revelaron que la muestra control (muestra de saliva humana sin tratar) contenía un total de $3,5 \times 10^7$ ufc/ml, incluyendo estreptococos del grupo viridans (80%) y *H. parainfluenzae* (20%) (Figs. 6.7 y 6.8A, sección VI.4.6). La identificación taxonómica de los estreptococos del grupo viridans reveló la presencia de las siguientes especies: *S. oralis*, *S. mitis*, *S. australis*, *S. infantis*, *S. cristatus* y *S. sanguinis*. Conviene recordar que los estreptococos del grupo viridans se encuentran entre los primeros colonizadores de la cavidad oral y son considerados miembros de la microbiota indígena del tracto respiratorio superior y (Könönen *et al.*, 2001). Sin embargo, la adición de InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio; 50 µM) provocó una reducción del número de bacterias viables (1,5 log) tras 10, 30 y 60 min de incubación, incluyendo un descenso del 70% en el número de *Streptococcus* spp. tras los primeros 10 min y una completa y persistente inhibición de los mismos tras 30 min de incubación. Por otra parte, mientras que el porcentaje de colonias identificadas como *H. parainfluenzae* permaneció constante, *St. aureus* se convirtió en la especie dominante tras el tratamiento con InfA_S (Fig. 6.8B, C y D, sección VI.4.6). En este sentido, debe señalarse que se ha descrito un efecto similar en la microbiota de la nasofaringe tras el uso de antibióticos para el tratamiento de infecciones de tracto respiratorio superior (Soriano y Rodríguez-Cerrato, 2002). Así, el empleo de amoxicilina, principal antibiótico prescrito para el tratamiento de las otitis medias, favorece la emergencia de *St. aureus* en la nasofaringe debido a la inhibición de la microbiota comensal que en condiciones fisiológicas contribuye a limitar el desarrollo de este

patógeno (Brook y Gober, 2009). En cualquier caso, a pesar de este efecto no deseado, conviene destacar que las bacteriocinas presentan una ventaja importante con respecto a los antibióticos, ya que mientras que la administración oral de estos resulta en su diseminación a compartimentos del cuerpo distintos del foco de infección, lo que puede conllevar la aparición de disbiosis y la selección de microorganismos resistentes en dichos lugares (Soriano y Rodríguez-Cerrato, 2002), las bacteriocinas, debido a su naturaleza proteica serían inactivadas por las enzimas proteolíticas de origen gástrico y pancreático (Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005b), lo que evitaría su diseminación en el organismo limitando, por tanto, la aparición de disbiosis y el desarrollo de resistencias bacterianas.

Considerados globalmente, los resultados de este trabajo de investigación ponen de manifiesto el interés de la bacteriocina antineumocócica InfA (InfA₁-InfA₂) de *S. infantarius* LP90, una cepa de origen lácteo, como estrategia alternativa o complementaria a la antibioterapia para el control de las infecciones causadas por *S. pneumoniae* en humanos mediante su utilización como ingrediente activo de preparaciones farmacéuticas orales. Sin embargo, el desarrollo de estudios orientados a la búsqueda de posibles alternativas para mejorar la actividad antimicrobiana de InfA frente a los *biofilms* neumocócicos, como el uso de combinaciones de bacteriocinas con distintos mecanismos de acción o con otros agentes antimicrobianos, es de suma importancia. Asimismo, la realización de ensayos *in vivo* es igualmente imprescindible para determinar fehacientemente si la actividad antimicrobiana *in vitro* de InfA (InfA₁-InfA₂) se puede traducir en su utilización exitosa en la práctica clínica.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

PRIMERA. La cepa *Streptococcus infantarius* subespecie *infantarius* LP90, aislada de leche de búfala, ejerce una potente actividad antimicrobiana frente a cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae* de diversos serotipos y patrones de susceptibilidad a los antibióticos más empleados en medicina humana.

SEGUNDA. Los resultados de los análisis *in vitro* revelaron que *Streptococcus infantarius* subespecie *infantarius* LP90 puede considerarse una cepa segura debido a la ausencia de resistencia a los antibióticos más empleados en medicina humana, factores de virulencia y actividades enzimáticas perjudiciales.

TERCERA. El análisis genético de un *cluster* de 17.730 pb del genoma de *Streptococcus infantarius* subespecie *infantarius* LP90 reveló la presencia de 12 genes que codifican 7 hipotéticas bacteriocinas, entre las que se incluyen 5 bacteriocinas de la subclase IIb o sistemas de dos péptidos: infantaricina A (infantaricina A₁-infantaricina A₂), infantaricina B (infantaricina B₁-infantaricina B₂), infantaricina C (infantaricina C₁-infantaricina C₂), infantaricina D (infantaricina D₁-infantaricina D₂) e infantaricina G (infantaricina G₁-infantaricina G₂) y dos bacteriocinas denominadas infantaricina E e infantaricina F, así como de 17 genes que codifican proteínas involucradas en la secreción, inmunidad y regulación de la producción de estas bacteriocinas.

CUARTA. Los resultados obtenidos mediante el empleo de diversos protocolos multicromatográficos de purificación a homogeneidad, degradación N-terminal de Edman, espectrometría de masas MALDI-TOF, producción heteróloga en *Pichia pastoris* y *Lactococcus lactis* y síntesis química de bacteriocinas, así como mediante el análisis transcripcional del *cluster* multibacteriocinogénico de *Streptococcus infantarius* subespecie *infantarius* LP90, demuestran que la actividad antineumocócica de esta cepa es debida a la acción sinérgica de la infantaricina A₁ e infantaricina A₂, que, por lo tanto, constituyen un nuevo sistema de dos péptidos (subclase IIb) al que se denominó infantaricina A.

QUINTA. La infantaricina A₁ e infantaricina A₂ sintetizadas químicamente y combinadas en proporción 1:1 actúan sinérgicamente y ejercen un potente efecto bactericida frente a *Streptococcus pneumoniae* desarrollado en saliva humana, lo que demuestra la funcionalidad de esta bacteriocina en este fluido biológico.

SEXTA. Considerados globalmente, los resultados de este trabajo de investigación ponen de manifiesto la utilidad de la bacteriocina antineumocócica infantaricina A (infantaricina A₁-infantaricina A₂) como ingrediente activo de preparaciones farmacéuticas orales en el contexto de una estrategia alternativa o complementaria a la antibioterapia para el control de las infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae* en humanos.

CHAPTER VIII

CONCLUSIONS

FIRST. *Streptococcus infantarius* subspecies *infantarius* LP90, isolated from water-buffalo milk, exerts a strong antimicrobial activity against clinical *Streptococcus pneumoniae* strains of different serotypes and susceptibility profiles to the antibiotics most commonly used in human medicine.

SECOND. The results from the *in vitro* assays revealed that *Streptococcus infantarius* subspecies *infantarius* LP90 may be recognized as safe due to the lack of resistance to the antibiotics most commonly used in human medicine, virulence factors and detrimental enzymatic activities.

THIRD. The genetic analysis of a 17,730-bp cluster of *Streptococcus infantarius* subspecies *infantarius* LP90 revealed the presence of 12 genes encoding 7 hypothetical bacteriocins, including 5 two-peptide bacteriocins (subclass IIb): infantaricin A (infantaricin A₁-infantaricin A₂), infantaricin B (infantaricin B₁-infantaricin B₂), infantaricin C (infantaricin C₁-infantaricin C₂), infantaricin D (infantaricin D₁-infantaricin D₂) and infantaricin G (infantaricin G₁-infantaricin G₂) and two one-peptide bacteriocins termed infantaricin E and infantaricin F, as well as 17 genes encoding proteins involved in the secretion, immunity and production regulation of these bacteriocins.

FOURTH. The results obtained by the use of different multi-chromatographic procedures of purification to homogeneity, N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation, MALDI-TOF mass spectrometry, heterologous production in *Pichia pastoris* and *Lactococcus lactis* and chemical synthesis of bacteriocins, as well as from the transcriptional analysis of the *Streptococcus infantarius* subspecies *infantarius* LP90 multibacteriocinogenic cluster, demonstrate that the anti-pneumococcal activity of this strain is due to the synergic action of infantaricin A₁ and infantaricin A₂ that, therefore, constitute a new two-peptide bacteriocin system (subclass IIb), which was termed infantaricin A.

FIFTH. Chemically-synthesized infantaricin A₁ and infantaricin A₂ combined in a 1:1 ratio act synergistically and exert a strong bactericidal effect against *Streptococcus pneumoniae* in human saliva, which demonstrates the bacteriocin functionality in this biological fluid.

SIXTH. Taken together, the results of this research work show the usefulness of the anti-pneumococcal bacteriocin infantaricin A (infantaricin A₁-infantaricin A₂) as an active ingredient for oral pharmaceutical preparations intended to be used as an alternative or complementary strategy to antibiotherapy for the control of human infections caused by *Streptococcus pneumoniae*.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, I. M., S. Markussen, T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson y K. Naterstad.** 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.*, 87: 35-43.
- Abee, T.** 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 129: 1-9.
- Abdelgadir, W., D. S. Nielsen, S. Hamad y M. Jakobsen.** 2008. A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *Int. J. Food Microbiol.*, 127: 215-219.
- Abdulmir, A. S., R. R. Hafidh, L. K. Mahdi, T. Al-Jeboori y F. Abubaker.** 2009. Investigation into the controversial association of *Streptococcus gallolyticus* with colorectal cancer and adenoma. *BMC Cancer*, 9: 403.
- Abriouel, H., R. Lucas, N. Ben Omar, E. Valdivia, M. Maqueda, M. Martínez-Canamero y A. Gálvez.** 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28: 383-397.
- Adams, M. R.** 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, 68: 171-178.
- Adolfsson, O., S. N. Meydani y R. M Russell.** 2004. Yogurt and gut function. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 245-56.
- Ahmed, Z., Y. Wang, Q. Cheng y M. Imran.** 2010. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 2843-2850.
- Aktypis, A., G. Kalantzopoulos, J. H. J. Huis in't Veld y B. ten Brink.** 1998. Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 568-576.
- Albertí, S., C. García-Rey, M. I. García-Laorden, R. Dal-Ré y J. García-de-Lomas. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens.** 2005. Survey of *emm*-like gene sequences from pharyngeal isolates of group C and group G streptococci collected in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 1433-1436.
- Allison, G. E., C. Ahnn, M. E. Stiles y T. R. Klaenhammer.** 1995. Utilization of the leucocin A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 131: 87-93.
- Al-Mathkhury, H. J., A. S. Ali y J. A. Ghafil.** 2011. Antagonistic effect of bacteriocin against urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *N. Am. J. Med. Sci.*, 3: 367-370.
- Alouf, J. E.** 1980. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). *Pharmacol. Ther.*, 11: 661-717.
- Ammor M. S., A. B. Flórez y B. Mayo.** 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 24: 559-70.
- Ammor M. S., A. B. Flórez, A. H. A. M van Hoek, C. de los Reyes-Gavilán, H. J. M. Aarts, A. Margolles y B. Mayo.** 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 14:6-15.
- Ampofo, K., A. T. Pavia, C. R. Stockmann, A. J. Blaschke, H. Y. C. Weng, K. E. Korgenski, J. Daly y C. L. Byington.** 2011. Evolution of the epidemiology of pneumococcal disease among Utah children through the vaccine era. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 30: 1100-1103.

- Anadón, A., M. R. Martínez-Larrañaga y M. A. Martínez.** 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 45: 91-95.
- Ananou, S., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, A. Gálvez y E. Valdivia.** 2007. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 45: 19-23.
- Anastasiou, R., M. Georgalaki, E. Manolopoulou, I. Kandarakis, L. de Vuyst y E. Tsakalidou.** 2007. The performance of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198 as starter cultura in Kasseru cheese production. *Int. Dairy J.*, 17: 208-217.
- Anastasiou, R., A. Aktypis, M. Georgalaki, M. Papadelli, L. de Vuyst y E. Tsakalidou.** 2009. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198 under conditions mimicking Kasseru cheese production and ripening. *Int. Dairy J.*, 5: 330-335.
- Anderssen, E. L., D. B. Diep, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer.** 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2269-2272.
- Angeletti, S., G. Dicuonzo, A. Avola, F. Crea, E. Dedej, F. Vailati, C. Farina y L. de Florio.** 2015. Viridans group Streptococci clinical isolates: MALDI-TOF mass spectrometry versus gene sequence-based identification. *PLoS One*, 10:e0120502.
- Aniansson, G., B. Alm, B. Andersson, A. Hakansson, P. Larson, O. Nylén, H. Peterson, P. Rignér, M. Svanborg, H. Sabharwal y C. Svanborg.** 1994. A prospective cohort study on breast-feeding and otitis media in Swedish infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 12: 183-188.
- Aponte, M., V. Fusco, R. Andolfi y S. Coppola.** 2008. Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese: Detection by different analytical approaches. *Int. Dairy J.*, 18: 403-413.
- Apte-Deshpnade, A., G. Mandal, S. Soorapaneni, B. Prasad, J. Kumar y S. Padmanabhan.** 2009. High-level expression of non-glycosylated and active staphylokinase from *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.*, 31:811-817.
- Aranha, C., S. Gupta y K. V. Reddy.** 2004. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide nisin: *in vitro* and *in vivo* studies. *Contraception*, 69: 333-338.
- Arias, C. A. y B. Murray.** 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Natur. Rev. Microbiol.*, 10: 266-278.
- Ashwell, M.** 2004. Conceptos sobre Alimentos Funcionales. Edición en Español. International Life Science Institute Press. Washington, EE. UU.
- Axelsson, L. y A. Holck.** 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.*, 177: 2125-2137.
- Axelsson, L., T. Katla, M. Bjornslett, V. G. H. Eijsink y A. Holck.** 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 168: 137-143.
- Aymerich, M. T. y M. Hugas.** 1998. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne*, 72: 39-50.
- Azpiroz, M. F., M. E. Poey y M. Laviña.** 2009. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*, 47: 274-280.

- Bagley, M. C., J. W. Dale, E. A. Merritt y X. Xiong. 2005. Thiopeptide antibiotics. *Chem. Rev.*, 105: 685-714.
- Bagnoli, F., M. Moschioni, C. Donati, V. Dimitrovska, I. Ferlenghi, C. Facciotti, A. Muzzi, F. Giusti, C. Emolo, A. Sinisi, M. Hilleringmann, W. Pansegrau, S. Censini, R. Rappuoli, A. Covacci, V. Masignani y M. A. A. Barocchi. 2008. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J. Bacteriol.*, 190: 5480-5492.
- Bahey-El-Din, M., C. G. M. Gahan y B. T. Griffin. 2010. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Curr. Gene Ther.*, 10: 34-45.
- Bakkal, S., S. M. Robinson y M. A. Riley. 2012. Bacteriocins of aquatic microorganisms and their potential applications in the seafood industry. En: "Health and environment in aquaculture", pp. 303-328, 1ª edición. Carvalho, E. D., G. Silva David y R. J. Silva (eds.). InTech, Rijeka, Croacia.
- Balakrishnan, M., R. S. Simmonds, A. Carne y J. R. Tagg. 2000. *Streptococcus mutans* strain N produces a novel low molecular mass non-lantibiotic bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 183: 165-169.
- Baltzer, S. A. y M. H. Brown. 2011. Antimicrobial peptides—Promising alternatives to conventional antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 228-235.
- Bari, M. L., D. O. Ukuku, T. Kawasaki, Y. Inatsu, K. Isshiki y S. Kawamoto. 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *J. Food Prot.*, 68: 1381-1387.
- Barile, S., C. Devirgiliis y G. Perozzi. 2012. Molecular characterization of a novel mosaic tet(S/M) gene encoding tetracycline resistance in foodborne strains of *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 158: 2353-2362.
- Barocchi, M. A., J. Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, B. Albiger, A. Kanth, S. Dahlberg, J. Fernebro, M. Moschioni, V. Masignani, K. Hultenby, A. R. Taddei, K. Beiter, F. Wartha, A. von Euler, A. Covacci, D. W. Holden, S. Normark, R. Rappuoli y B. Henriques-Normark. 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 2857-2862.
- Barricarte, A., J. Castilla, A. Gil-Setas, L. Torroba, J. A. Navarro-Alonso, F. Irisarri y M. Arriazu. 2007. Effectiveness of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine: a population-based case-control study. *Clin. Infect. Dis.*, 44: 1436-1441.
- Basanta, A. 2007. Evaluación de la enterocina L50 (L50 A y L50 B) de *Enterococcus faecium* L50 como bioconservante de la cerveza. Producción y secreción heteróloga de las enterocinas L50A y L50B en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Basanta, A., J. Sánchez, B. Gómez-Sala, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas. 2008. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer- spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *Int. J. Food Microbiol.*, 31: 293-307.
- Basanta, A., C. Herranz, J. Gutiérrez, R. Criado, P. E. Hernández y L. M. Cintas. 2009. Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting the leaderless enterocin L50 peptides L50A and L50B from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 2382-2392.

- Basanta, A., B. Gómez-Sala, J. Sánchez, D. B. Diep, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2010. Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 3314-3324.
- Beaulieu, L., D. Groleau, C. B. Miguez, J. F. Jetté, H. Aomari y M. Subirade.** 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr. Purif.*, 43: 111-125.
- Bechinger, B.** 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 157-183.
- Begley, M., C. G. M. Gaha y C. Hill.** 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 625-651.
- Begley, M., C. Hill y C. G. Gahan.** 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1729-1738.
- Benkerroum, N., Y. Ghouati, H. Ghalfi, T. Elmejdoub, D. Roblain, P. Jacques y P. Thonart.** 2002. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model cultured milk (Iben) by *in situ* bacteriocin production from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Int. J. Dairy Technol.*, 55: 145-151.
- Bergmann, S., M. Rohde y S. Hammerschmidt.** 2004. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surfacedisplayed plasminogen-binding protein. *Infect. Immun.*, 72: 2416-2419.
- Bergmann, S., M. Rohde, K. T. Preissner y S. Hammerschmidt.** 2005. The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb. Haemost.*, 94: 304-311.
- Bermúdez-Humarán, L. G., P. Kharat, J. M. Chatel y P. Langella.** 2011. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb. Cell Fact.*, 10: S4.
- Bermúdez-Humarán, L. G., C. Aubry, J. P. Motta, C. Deraison, L. Steidler, N. Vergnolle, J. M. Chatel y P. Langella.** 2013. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Curr. Opin. Microbiol.*, 16: 278-283.
- Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. Henri-Dubernet y M. Gueguen.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 278-285.
- Bernbom, N., T. R. Licht, C. H. Brogren, B. Jelle, A. H. Johansen, I. Badiola, F. K. Vogensen y B. Nørrung.** 2006. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 239-244.
- Berry, A. M y J. C. Paton.** 1996. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 64: 5255-5262.
- Berry A. M. y J. C. Paton.** 2000. Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.*, 68: 133-140.
- Bhatti, M., A. Veeramachaneni y L. A. Shelef.** 2004. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 97: 215-219.

- Bibiloni, R., R. N. Fedorak, G. W. Tannock, K. L. Madsen, P. Gionchetti, M. Campieri, C. de Simone y R. B. Sartor.** 2005. VSL#3 Probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.*, 100: 1539-1546.
- Birri, D. J., D. A. Brede y I. F. Nes.** 2011. Salivaricin D, a novel intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from healthy infant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 402-410.
- Björkroth, K. J., R. Geisen, U. Schillinger, N. Weiss, P. de Vos, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala y P. Vandamme.** 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3764-3772.
- Blanco-Massani, M., M. R. Fernández, A. Ariosti, P. Eisenberg y G. Vignolo.** 2008. Development and characterization of an active polyethylene film containing *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, 25: 1424-1430.
- Blanco-Massani, M., P. J. Morando, G. M. Vignolo y P. Eisenberg.** 2012. Characterization of a multilayer film activated with *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins. *J. Sci. Food Agric.*, 92: 1318-1323.
- Bluestone, C. D., J. S. Stephenson y L. M. Martín.** 1992. Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 11: S7-S11.
- Böer, E., G. Steinborn, G. Kunze y G. Gellissen.** 2007. Yeast expression platforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77: 513-523.
- Boleij, A., C. M. Muyltjens, S. I. Bukhari, N. Cayet, P. Glaser, P. W. Hermans, D. W. Swinkels, A. Bolhuis y H. Tjalsma.** 2011. Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with colorectal cancer. *J. Infect. Dis.*, 203: 1101-1109.
- Bolotin, A., B. Quinquis, P. Renault, A. Sorokin, S. D. Ehrlich, S. Kulakauskas, A. Lapidus, E. Goltsman, M. Mazur, G. D. Pusch, M. Fonstein, R. Overbeek, N. Kyprides, B. Purnelle, D. Prozzi, K. Ngui, D. Masuy, F. Hancy, S. Burteau, M. Boutry, J. Delcour, A. Goffeau y P. Hols.** 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.*, 22: 1554-1558.
- Borrero, J.** 2012. Caracterización de bacteriocinas y desarrollo de herramientas genéticas para su producción heteróloga en otras bacterias lácticas (BAL) y en las levaduras *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y *Arxula adeninivorans*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Borrero, J., D. A. Brede, M. Skaugen, D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2011a. Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Ana platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 369-373.
- Borrero, J., J. J. Jiménez, L. Gutiérrez, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2011b. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, 156: 76-86.
- Boswihi, S. S., E. E. Udo y N. Al-Sweih.** 2012. Serotypes and antibiotic resistance in Group B *streptococcus* isolated from patients at the Maternity Hospital, Kuwait. *J. Med. Microbiol.*, 61: 126-131.

- Boulnois, G. J., J. C. Paton, T. J. Mitchell y P. W. Andrew.** 1991. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 5: 2611-2616.
- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh y 16 autores más.** 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.*, 154: 87-97.
- Bouttefroy, A. y J. B. Millière.** 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.*, 62: 65-75.
- Bouvet, A., F. Grimont, M. D. Collins, F. Benaoudia, C. Devine y B. Regnault.** 1997. *Streptococcus infantarius* sp. nov. related to *S. bovis* and *S. equinus*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 418: 393-395.
- Bower, C. K., M. K. Bothwell y J. McGuire.** 2001. Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids Surf. B: Interfaces*, 22: 259-265.
- Bower, C. K., J. E. Parker, A. Z. Higgins, M. E. Oest, J. T. Wilson, B. A. Valentin, M. K. Bothwell y J. McGuire.** 2002. Protein antimicrobial barrier to bacterial adhesion: *in vitro* and *in vivo* evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids Surf. B: Interfaces*, 25: 81-90.
- Braido, F., M. Bellotti, A. De Maria, M. Cazzola y G. W. Canonica.** 2008. The role of pneumococcal vaccine. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 21:608-15.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela y P. J. Barr.** 1984. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 4642-4646.
- Brandão, A., T. Almeida, E. Muñoz-Atienza, C. Torres, G. Igrejas, P. E. Hernández, L. M. Cintas, P. Poeta y C. Herranz.** 2010. Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch. Microbiol.*, 192: 927-936.
- Brook, I.** 2013. Acute sinusitis in children. *Pediatr. Clin. North. Am.*, 60: 409-424.
- Brook, I. y A. E. Gober.** 2009. The effects of treatment of acute otitis media with a low dose vs a high dose of amoxicillin on the nasopharyngeal flora. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 135: 458-461.
- Brumfitt, W., M. R. Salton y J. M. Hamilton-Miller.** 2002. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50: 731-734.
- Brurberg, M. B., I. F. Nes y V. G. H. Eijsink.** 1997. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.*, 26: 347-360.
- Bryan, E. M., T. Bae, M. Kleerebezem y G. M. Dunny.** 2000. Improved vectors for nisin-controlled expression in Gram-positive bacteria. *Plasmid*, 44: 183-190.
- Budič, M., M. Rijavec, Ž. Petkovšek y D. Žgur-Bertok.** 2011. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS One*, 6: e28769.
- Burton, J. P., P. A. Wescombe, C. J. Moore, C. N. Chilcott y J. R. Tagg.** 2006. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 3050-3053.
- Butler, J. C., R. F. Breiman, H. B. Lipman, J. Hofmann y R. R. Facklam.** 1995. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in United States, 1978-1994.: implications for development of a conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.*, 171: 885-889.

- Cagno, C. K., J. M. Pettit y B. D. Weiss.** 2012. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: update CDC guideline. *Am. Fam. Physician.*, 86: 59-65.
- Callewaert, R., M. Hugas y L. de Vuyst.** 2000. Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 57: 33-42.
- Callon, C., L. Millet y M. C. Montel.** 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.*, 71: 231-244.
- Calo-Mata, P., S. Arlindo, K. Boheme, T. de Miguel, A. Pascoal y J. Barros-Velazquez.** 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol.*, 1: 43-63.
- Campbell, I.** 1997. Beer. En: “*Food microbiology: fundamentals and frontiers*”, pp. 662-670. Doyle, M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (eds.). ASM Press, Nueva York, NY, EE.UU.
- Caplice, E. y G. F. Fitzgerald.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 131-149.
- Carapetis, J. R., A. C. Steer, E. K. Mulholland y M. Weber.** 2005. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect. Dis.*, 5: 685-694.
- Cardozo, D. M., C. M. Nascimento-Carvalho, A. L. Andrade, A. M. Silvany-Neto, C. H. Daltro, M. A. Brandao, A. P. Brandao y M. C. Brandileone.** 2008. Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among adolescents. *J. Med. Microbiol.*, 57: 185-189.
- Carolissen-Mackay, V., G. Arendse y J. W. Hastings.** 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.*, 34: 1-16.
- Carr, F. J., D. Chill y N. Maida.** 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28: 281-370.
- Casalta, E. y M. C. Montel.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 271-273.
- Casaus, P.** 1998. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287-2294.
- Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Lloubès, K. Postle, M. Riley, S. Slatin y D. Cavard.** 2007. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: 158-229.
- Castor, M. L., C. G. Whitney, K. Como-Sabetti, R. R. Facklam, P. Ferrieri, J. M. Bartkus, B. A. Juni, P. R. Cieslak, M. M. Farley, N. B. Dumas, S. J. Schrag y R. Lynfield.** 2008. Antibiotic resistance patterns in invasive group B streptococcal isolates. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 2008: 727505.
- Cattoir, V., L. Merabet, P. Legrand, C. J. Soussy y R. Leclercq.** 2007. Emergence of a *Streptococcus pneumoniae* isolate resistant to streptogramins by mutation in ribosomal protein L22 during pristinamycin therapy of pneumococcal pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59: 1010-1012.

- Cederland, A., G. H. Gudmundsson y B. Agerberth.** 2011. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.*, 278: 3942-3951.
- Cereghino, G. P. y J. M. Cregg.** 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10: 422-427.
- Cereghino, G. P. y J. M. Cregg.** 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 45-66.
- Cha, D. S., J. Chen, H. J. Park y M. S. Chinnan.** 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in tofu by use of a polyethylene film coated with a cellulosic solution containing nisin. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 38: 499-503.
- Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie y W. A. van der Donk.** 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.*, 105: 633-684.
- Chavanet, P.** 2012. Pneumococcus infections: is the burden still as heavy? *Med. Mal. Infect.*, 42: 149-153.
- Chaves-López, C., A. Serio, M. Martuscelli, A. Paparella, E. Osorio-Cadavid y G. Suzzi.** 2011. Microbiological characteristics of kumis, a traditional fermented Colombian milk, with particular emphasis on enterococci population. *Food Microbiol.*, 28: 1014-1047.
- Cheigh, C. I. e Y. R. Pyun.** 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.*, 27: 1641-1648.
- Chen, H. y D. G. Hoover.** 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2: 82-100.
- Chen, Y., R. Shapira, M. Eisentein y T. J. Montville.** 1997. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 524-531.
- Chikindas, M. L. y T. J. Montville.** 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. En: "Control of foodborne microorganisms", pp. 303-321. Junerja, V. K. y J. N. Sofos (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Chikindas, M. L., K. Venema, A. M. Ledeboer, G. Venema y J. Kok.** 1995a. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21: 183-189.
- Chikindas, M. L., J. Novak, A. J. Driessen, W. N. Konings, K. M. Schilling y P. W. Caufield.** 1995b. Mutacin II, a bactericidal antibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 2656-2660.
- Chilcott, C. N. and J. R. Tagg:** US20050079597 (2005).
- Chow, V. C., P. M. Hawkey, E. W. Chan, M. L. Chin, T. K. Au, D. K. Fung y R. C. Chan.** 2007. High-level gentamicin resistance mediated by a Tn4001-like transposon in seven nonclonal hospital isolated of *Streptococcus pasteurianus*. *Antimicrob. Agents Chermother.*, 51: 2508-2513.
- Christensen, L. R. y C. M. Macleod.** 1945. A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation, and reaction with inhibitors. *J. Gen Physiol.*, 28: 559-583.
- Christie, P. J.** 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.*, 40: 294-305.

- Cintas, L. M.** 1995. Caracterización bioquímica y genética de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Cintas, L. M. y P. Casaus.** 1998. La necesidad de conservar los alimentos. Bioconservación. *Alim. Equip. Tecnol.*, diciembre: 89-95.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643-2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández e I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321-4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes y L. S. Håvarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180: 1988-1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández y P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.*, 15: 289-298.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000a. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I). Ácidos orgánicos, metabolitos del oxígeno y productos finales del catabolismo. *Alim. Equip. Tecnol.*, julio-agosto: 83-90.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000b. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (II). Bacteriocinas. *Alim. Equip. Tecnol.*, septiembre: 109-119.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000c. Bacterias lácticas de origen alimentario. Consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria*, 318: 61-70.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández e I. F. Nes.** 2000d. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806-6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*, 7: 281-305.
- Citti, R.** 2005. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Claesson, M. J., D. van Sinderen y P. W. O'Toole.** 2007. The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 269: 22-28.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes y M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 1-20.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EE.UU.

- Cocolin, L. y K. Rantsiou.** 2007. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76: 1403-1411.
- Cole, K., M. B. Farnell, A. M. Donoghue, N. J. Stern, E. A. Svetoch, B. N. Eruslanov, L. I. Volodina, Y. N. Kovalev, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk, V. D. Pokhilenko, V. N. Borzenkov, O. E. Svetoch, T. Y. Kudryavtseva, I. Reyes-Herrera, P. J. Blore, F. Solis de los Santos y D. J. Donoghue.** 2006. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poult. *Poult. Sci.*, 85: 1570-1575.
- Collins, B., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2010. Application of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 89-109, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Comelli, E. M., B. Guggenheim, F. Stingle y J. R. Neeser.** 2002. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur. J. Oral Sci.*, 110: 218-224.
- Cook, L. C., B. LaSarre y M. J. Federle.** 2013. Interspecies communication among commensal and pathogenic streptococci. *MBio.* 4: e00382-13.
- Cookson, A. L., S. J. Noel, W. J. Kelly y G. T. Attwood.** 2004. The use of PCR for the identification and characterisation of bacteriocin genes from bacterial strains isolated from rumen or caecal contents of cattle and sheep. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48: 199-207.
- Corr, S. C., C. G. Gahan, y C. Hill.** 2007. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 50: 380-388.
- Cotter, P. D.** 2014. An ‘Upp?-turn in bacteriocin receptor identification. *Mol. Microbiol.*, 92: 1159-1163.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005a. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 6: 61-75.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, 3: 777-788.
- Cotter, P. D., R. Paul Ross y C. Hill.** 2013. Bacteriocins- a available alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.*, 11:95-105.
- Courtin, P., V. Monnet y F. Rul.** 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, 148: 3413-3421.
- Coykendall, A. L., y K. B. Gustafson.** 1985. Deoxyribonucleic acid hybridations amongs strains of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus bovis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 274-280.
- Crandall, A. D. y T. J. Montville.** 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 231-237.
- Cregg, J. M., T. S. Vedvick y W. C. Raschke.** 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnol.*, 11: 905-910.
- Cregg, J. M., J. L. Cereghino, J. Shi y D. R. Higgins.** 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.*, 16: 23-52.
- Creti, R., G. Gherardi, M. Imperi, C. von Hunolstein, L. Baldassarri, M. Pataracchia, G. Alfaroni, F. Cardona, G. Dicunso y G. Orefici.** 2005. Association of group A streptococcal emm types with

- virulence traits and macrolide-resistance genes is independent of the source of isolation. *J. Med. Microbiol.*, 54: 913-917.
- Criado, R.** 2006. Caracterización inmunoquímica y genética de la producción de las enterocinas L50, P y Q por *Enterococcus faecium* L50. Secuencia nucleotídica y análisis funcional de los plásmidos pCIZ1 y pCIZ2. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Criado R., D. B. Diep, Å. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2006. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 6653-6666.
- Crispie, F., D. Twomey, J. Flynn, C. Hill, P. Ross y W. Meaney.** 2005. The lantibiotic lactacin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.*, 72: 159-167.
- Cui, Y., C. Zhang, Y. Wang, J. Shi, L. Zhang, Z. Ding, X. Qu y H. Cui.** 2012. Class IIa bacteriocins: diversity and new developments. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 16668-16707.
- Cunningham, M. W.** 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol. Rev.*, 13: 470-511.
- Daeschel, M. A.** 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, 43: 164-167.
- Daeschel, M. A.** 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. En: "*Bacteriocins of lactic acid bacteria*", pp. 63-91. Hoover, D. G. y L. R. Steenson (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Dagan, R., R. Melamed, M. Muallem, L. Piglansky y P. Yagupsky.** 1996. Nasopharyngeal colonization in southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.*, 174: 1352-1355.
- Dahl, K. H. y A. Sundsfjord.** 2003. Transferable *vanB2* Tn5382-containing elements in fecal streptococcal strains from veal calves. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 2579-2583.
- Dalet, K., C. Briand, Y. Cenatiempo e Y. Héchar.** 2000. The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.*, 41: 441-443.
- Dalet, K., Y. Cenatiempo, P. Cossart e Y. Héchar.** 2001. A σ^{54} -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology*, 147: 3263-3269.
- Daly, M. M., S. Doktor, R. Flann y D. Shortridge.** 2004. Characterization and prevalence of *mef(A)*, *mef(E)*, and the associated *msr(D)* gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 3570-3574.
- Danne, C., J. M. Entenza, A. Mallet, R. Briandet, M. Débarbouillé, F. Nato, P. Glaser, G. Jouvion, P. Moreillon, P. Trieu-Cuot y S. Dramsi.** 2011. Molecular characterization of a *Streptococcus gallolyticus* genomic island encoding a pilus involved in endocarditis. *J. Infect. Dis.*, 204: 1960-1970.
- Dassa, E.** 2000. ABC transport. En: "*Encyclopedia of microbiology, vol. I*", pp. 1-12. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.

- Dassa, E. y P. Bouige.** 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.*, 152: 211-229.
- Dave, S., A. Brooks-Walter, M. K. Pangburn y L. S. McDaniel.** 2001. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect. Immun.*, 69: 3435-3437.
- David, F., G. de Cespédès, F. Delbos y T. Horaud.** 1993. Diversity of chromosomal genetic elements and gene identification in antibiotic-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus bovis*. *Plasmid*, 29: 147-153.
- Davies, D.** 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2: 114-122.
- Davies, E. A. y J. Delves-Broughton.** 2000. Nisin. En: “*Encyclopedia of food microbiology*”, pp. 183-191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Daw, M. A. y F. R. Falkner.** 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, 27: 467-479.
- DeAngelis, P. L., J. Papaconstantinou y P. H. Weigel.** 1993. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.*, 268: 19181-19184.
- De Jong, A., S. A. F. T. van Hijum, J. J. E. Bijlsma, J. Kok y O. P. Kuipers.** 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.*, 34: 273-279.
- De Kwaadsteniet, M., T. Fraser, C. A. van Reenen y L. M. T. Dicks.** 2006. Bacteriocin T8, a novel class IIa *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 4761-4766.
- De la Fuente-Salcido, N. M., J. E. Barboza-Corona, A. N. Espino Monzón, R. D. Pacheco Cano, N. Balagurusamy, D. K. Bideshi y R. Salcedo-Hernández.** 2012. Expanding the use of a fluorogenic method to determine activity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Sci. World J.*, 2012: 503269. doi: 10.1100/2012/503269.
- De la Pedrosa, E. G. G., M. I. Morosini, M. van der Linden, P. Ruiz-Garbajosa, J. C. Galán, F. Baquero, R. R. Reinert y R. Cantón.** 2008. Polyclonal population structure of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain carrying *mef* and *mef* plus *erm*(B). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52: 1964-1969.
- De Saizieu, A., C. Gardes, N. Flint, C. Wagner, M. Kamber, T. J. Mitchell, W. Keck, K. E. Amrein y R. Lange.** 2000. Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J. Bacteriol.*, 182: 4696-4703.
- De Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer y W. B. Whitman.** 2009. The Firmicutes. En: “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”, vol. 3, 2ª edición. Springer, Nueva York, NY, EE.UU.
- De Vuyst, L. y F. Leroy.** 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13: 194-199.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill y P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16: 1058-1071.

- Delorme, C.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 274-277.
- Delves-Broughton, J.** 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57: 525-527.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans y J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 193-202.
- Destoumieux-Garzón, D., J. Peduzzi y S. Rebuffat.** 2002. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*, 84: 511-519.
- Desvaux, M., N. J. Parham e I. R. Henderson.** 2004. The autotransporter secretion system. *Res. Microbiol.*, 155: 53-60.
- Devirgiliis, C., S. Barile, A. Caravelli, D. Coppola y G. Perozzi.** 2010. Identification of tetracycline- and erythromycin-resistant Gram-positive cocci within the fermenting microflora of an Italian dairy food product. *J. Appl. Microbiol.*, 109: 313-323.
- Devirgiliis C., S. Barile y G. Perozzi.** 2011. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes Nutr.*, 6: 275-284.
- Di Pierro, F., G. Donato, F. Fomia, T. Adami, D. Careddu, C. Cassandro y R. Albera.** 2012. Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* and recurrent acute otitis media. *Int. J. Gen. Med.*, 5: 991-997.
- Díaz, M., E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, M. Fernández, A. Santos, H. Ramírez-Rodrigo y M. Maqueda.** 2003. Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1229-1236.
- Díaz-Ruiz, G., J. P. Guyot, F. Ruiz-Teran, J. Morlon-Guyot y C. Wachter.** 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4367-4374.
- Diep, D. B. e I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets*, 3: 107-122.
- Diep, D. B., L. S. Håvarstein e I. F. Nes.** 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.*, 18: 631-639.
- Diep, D. B., L. S. Håvarstein e I. F. Nes.** 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, 178: 4472-4483.
- Diep, D. B., L. Axelsson, C. Grefslis e I. F. Nes.** 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology*, 146: 2155-2160.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo e I. F. Nes.** 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 2384-2389.
- Dieye, Y., A. J. W. Hoekman, F. Clier, V. Juillard, H. J. Boot y J. C. Piard.** 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 7281-7288.

- Díez-González, F.** 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 8: 15-23.
- Diplock, A. T., P. J. Aggett, M. Ashwell, F. Bornet, E. B. Fern y M. B. Roberfroid.** 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br. J. Nutr.*, 81: 1-27.
- Dobson, A., P. M. O'Connor, P. D. Cotter, R. P. Ross y C. Hill.** 2011. Impact of the broad-spectrum antimicrobial peptide, lacticin 3147, on *Streptococcus mutans* growing in a biofilm and in human saliva. *J. Appl. Microbiol.*, 111: 1515-1523.
- Dockrell, D. H., M. K. Whyte y T. J. Mitchell.** 2012. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest*, 142: 482-491.
- Domenech, M., E. García y M. Moscoso.** 2011. *In vitro* destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 55: 4144-4148.
- Domenech, M., R. Ramos-Sevillano, M. Moscoso y J. Yuste.** 2013. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 81: 2606-2615.
- Dos Santos-Nascimento, J., P. Carlin, M. A. Vasconcelos, K. R. Netto y M. C. F. Bastos.** 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, 106: 61-71.
- Dos Santos-Nascimento, J. S., H. Ceotto, S. B. Nascimento, M. Giambiagi-deMarval, K. R. N. Santos y M. C. F. Bastos.** 2006. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, 42: 215-221.
- Drancourt, M., V. Roux, P. E. Fournier y D. Raoult.** 2004. *rpoB* gene sequence-based identification of aerobic gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 497-504.
- Drapper, L. A., K. Grainger, L. H. Deegan, P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2009. Cross-immunity and immune mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lacticin 3147. *Mol. Microbiol.*, 71: 1043-1054.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen y H. Prevost.** 2006. The continuing history of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 564-582.
- Driessen, A. J. M. y C. van der Does.** 2002. Protein export in bacteria. En: "*Protein targeting, transport and translocation*", pp. 47-73. Dalbey, R. E. y G. von Heijne (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Driessen, A. J. M. y N. Nouwen.** 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, 77: 643-667.
- Duport, C., C. Baysse e Y. Michel-Briand.** 1995. Molecular characterization of pyocin S3, a novel S-type pyocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 270: 8920-8927.
- Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi y S. Rebuffat.** 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 24: 708-734.
- Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax.** 2002. "*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*". Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.

- Eberhard, T., G. Kronvall y M. Ullberg.** 1999. Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb. Pathog.*, 26: 175-181.
- EFSA.** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.*, 226: 1-12.
- EFSA.** 2005b. Summary report of the EFSA Scientific Colloquium on Qualified Presumption of Safety of micro-organisms in food and feed. 13-14 December 2004, Brussels, Belgium. ISBN 92-9199-012-4. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/colloquiaqps.pdf>.
- EFSA.** 2007. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.*, 587:1-16.
- EFSA.** 2008. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.*, 732: 1-15.
- EFSA.** 2011. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.*, 9: 1-82.
- EFSA.** 2012a. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.*, 10: 2740-2749.
- EFSA.** 2012b. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA J.*, 10: 2682. [10 pp.]
- EFSA.** 2012c. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). *EFSA J.*, 10: 3020. [84 pp.]
- EFSA.** 2013. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA J.*, 11: 3449. [105 pp.]
- EFSA.** 2014. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 1: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until October 2014. *EFSA J.*, 12: 3938. [41 pp.]
- Eijsink, V. G. H., M. B. Brurberg, P. H. Middelhoven e I. F. Nes.** 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.*, 178: 2232-2237.
- Eijsink, V. G. H., M. Skeie, P. H. Middelhoven, M. B. Brurberg e I. F. Nes.** 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3275-3281.
- Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo e I. F. Nes.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 639-654.
- El Bassi, L., M. Hassouna, N. Shinzato y T. Matsui.** 2009. Biopreservation of refrigerated and vacuum-packed *Dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. *J. Food Sci.*, 74: M335-339.
- Ennahar, S., K. Sonomoto y A. Ishizaki.** 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.*, 87: 705-716.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto y A. Ishizaki.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 85-106.

- Epand, R. M. y H. J. Vogel.** 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 11-28.
- Ergin, A., Ö. K. Eser y G. Hasçelik.** 2011. Erythromycin and penicillin resistance mechanisms among viridans group streptococci isolated from blood cultures of adult patients with underlying disease. *New. Microbiol.*, 34: 187-193.
- European Commission.** 2003. On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production. Health & Consumer Protection Directorate-General. Directorate C- Scientific Opinions. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf.
- European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) N° 1831/2003.** Appendixes 3e & 4I. Annex I: List of Additives. Edition 185. Health and Consumers Directorate General. Directorate G-Veterinary and International Affairs. Unit G1 Animal Nutrit. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf. Fecha de consulta: junio de 2015.
- Euzéby, J. P.** 2010. *Streptococcus* Rosenbach 1884, genus. In: *List of bacterial names with standing in nomenclature*. <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptococcus.html>.
- Facklam, R.** 2002. What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 613-630.
- FAO/WHO.** 2002. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, London Ontario, Canada.
- Farrow, J. A. E., J. Kruze, B. A. Phillips, A. J. Bramley, y M. D. Collins.** 1984. Taxonomic studies on *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equines*: description of *Streptococcus alactolyticus* sp. nov. and *Streptococcus saccharolyticus* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* 5: 467-482.
- Fath, M. J. y R. Kolter.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 57: 995-1017.
- Fekkes, P. y A. J. M. Driessen.** 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrana. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 161-173.
- Fenoll, A., J. J. Granizo, L. Aguilar, M. J. Giménez, L. Aragoneses-Fenoll, G. Hanquet, J. Casal y D. Tarrago.** 2009. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J. Clin. Microbiol.*, 47: 1012-1020.
- Fett, W. F. y G. T. Maher.** 1985. Bacteriocin production by *Xanthomonas campestris* pv *glycines*. *Phytopathology*, 75: 1280.
- File, T. M.** 2003. Community-acquired pneumonia. *Lancet*, 362: 1991-2001.
- Fimland, G., O. R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I. F. Nes y J. Nissen-Meyer.** 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3313-3318.
- Fimland, G., R. Jack, G. Jung, I. F. Nes y J. Nissen-Meyer.** 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center towards the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 5057-5060.

- Fimland, G., V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer.** 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology*, 148: 3661-3670.
- Fimland, G., L. Johnsen, B. Dalhus y J. Nissen-Meyer.** 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.*, 11: 688-696.
- Fleet, G. H.** 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 101-117.
- Fleet, G. H.** 2001. Wine. En: “*Food Microbiology: fundamentals and frontiers*”, pp. 671-694. Doyle, M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (eds.). ASM Press, Nueva York, NY., EE.UU.
- Fontaine, L., C. Boutry, E. Guédon, A. Guillot, M. Ibrahim, B. Grossiord y P.Hols.** 2007. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, 189: 7195-7205.
- Foulquié-Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou y L. de Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106: 1-24.
- Franke, C. M.** 1998. Topology of a type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Franz, C. M. y W. H. Holzapfel.** 2012. Examples of lactic-fermented foods of the African continent. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 265-284, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Franz, C. M., U. Schillinger y W. H. Holzapfel.** 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 255-270.
- Franz, C. M., R. W. Worobo, L. E. N. Quadri, U. Schillinger, W. H. Holzapfel, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1999. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2170-2178.
- Franz, C. M., M. J. van Belkum, R. W. Worobo, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 2000. Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology*, 146: 621-631.
- Franz, C. M., G. S. Cho, W. H. Holzapfel y A. Gálvez.** 2010. Safety of lactic acid bacteria. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 341-359, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Franz, C. M., M. Huch, H. Abriouel, W. Holzapfel y A. Gálvez.** 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 151: 125-140.
- Fremaux, C., C. Ahn y T. R. Klaenhammer.** 1993. Molecular analysis of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3906-3915.
- Fremaux, C., Y. Hécharde y Y. Cenatiempo.** 1995. Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*, 141: 1637-1645.
- Fuller R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378.

- Gabrielsen, C., D. A. Brede, P. E. Hernandez, I. F. Nes y D. B. Diep.** 2012. The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56: 2908-2915.
- Gajic, O.** 2003. Relationships between MDR proteins, bacteriocin production and proteolysis in *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Galloway-Peña, J., L. B. Rice y B. E. Murray.** 2011. Analysis of PBP5 of early U.S. isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55: 3272-3277.
- Galloway-Peña, J., J. H. Roh, M. Latorre, X. Qin y B. E. Murray.** 2012. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS One*, 7: e30187.
- Gálvez, A., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno y E. Valdivia.** 1989. Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.*, 140: 57-68.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López y N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120: 51-70.
- Galvin, M., C. Hill y R. P. Ross.** 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28: 355-358.
- Gänzle, M. G., C. Hertel, J. M. B. M. van der Vossen y W. P. Hammes.** 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microbiol.*, 48: 21-35.
- Gardiner, E. G., R. P. Ross, P. M. Kelly, C. Stanton, J. U. D. Collins y G. Fitzgerald.** 2002. Microbiology of therapeutic milks. En: "Dairy Microbiology Handbook", pp. 431-466. Robinson, R. K. (ed.). J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Garneau, S., N. I. Martin y J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577-592.
- Garnier, F., G. Gerbaud, P. Courvalin y M. Galimand.** 1997. Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2337-2341.
- Garriga, M., T. Aymerich, S. Costa, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2000. Las altas presiones en combinación con bacteriocinas como nueva tecnología de conservación en productos cárnicos. *Eurocarne*, 87: 59-63.
- Geisen, R. y W. H. Holzapfel.** 1996. Genetically modified starter and protective cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, 30: 315-324.
- Gellissen, G., G. Kunze, C. Gaillardin, J. M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis e I. van der Klei.** 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*: a comparison. *FEMS Yeast Res.*, 5: 1079-1096.
- Georgalaki, M. D., P. Sarantinopoulos, E. S. Ferreira, L. De Vuyst, G. Kalantzopoulos y E. Tsakalidou.** 2000. Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasseri cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 817-825.

- Georgalaki, M. D., E. Van den Berghe, D. Kritikos, B. Devreese, J. Van Beeumen, G. Kalantzopoulos, L. De Vuyst y E. Tsakalidou.** 2002. Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5891-5903.
- Georgalaki, M., E. Manolopoulou, R. Anastasiou, M. Papadelli y E. Tsakalidou.** 2009. Detection of *Streptococcus macedonicus* in Greek cheeses. *Int. Dairy J.*, 19: 96-99.
- Georgalaki, M., K. Papadimitriou, R. Anastasiou, B. Pot, G. Van Driessche, B. Devreese y E. Tsakalidou.** 2013. Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food Microbiol.*, 33:124-130.
- Germain, R. N. y L. R. Hendrix.** 1991. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature*, 353: 134-139.
- Gertz, R. E., Z. Pimenta, D. Jackson, B. A. Juni, R. Lynfield, J. H. Jorgensen, M. G. Carvalho, B. W. Beall; Active Bacterial Core Surveillance Team.** 2010. Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era. *J. Infect. Dis.*, 201: 770-775.
- Gherardi, G., M. Imperi, C. Palmieri, G. Magi, B. Facinelli, L. Baldassarri, M. Pataracchia y R. Creti.** 2013. Genetic diversity and virulence properties of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* from different sources in Italy. *J. Med. Microbiol.*, 63: 90-98.
- Giebink, G. S.** 2000. Otitis media: the chinchilla model. En: "Streptococcus pneumoniae. *Molecular biology and mechanisms of disease*", pp. 433-443. A. Tomasz (ed.). Mary Ann Liebert, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Gilbreth, S. E. y G. A. Somkuti.** 2005. Thermophilin 110: a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. *Curr. Microbiol.*, 51: 175-182.
- Gillor, O., y L. Ghazaryan.** 2007. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 2: 115-122.
- Gillor, O., L. M. Nigro y M. A. Rile.** 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharmac. Design*, 11: 1067-1075.
- Gilmore, M. S., R. Lebreton y W. van Schaik.** 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr. Opin. Microbiol.*, 16: 10-16.
- Ginsburg, I.** 1972. Mechanisms of cell and tissue injury induced by group A streptococci: relation to poststreptococcal sequelae. *J. Infect. Dis.*, 126: 419-456.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 163-171.
- Giraffa, G., N. Chanishvili e Y. Widyastuti.** 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.*, 161: 480-487.
- Glazunova, O. O., D. Radoult y V. Roux.** 2009. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, 59: 2317-2322.
- Glazunova, O. O., D. Raoult y V. Roux.** 2010. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60: 2140-2148.

- Goldstein, B. P., J. Wei, K. Greenberg y R. Novick.** 1998. Activity of nisin against *S. pneumoniae*, *in vitro*, and in a mouse infection model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42: 277-278.
- Gómez, M. E.** 2012. Estructura poblacional de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia a macrólidos asociada a bombas de eflujo (genes *mef*) y mecanismos duales [genes *mef* y *erm(B)*]. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Gómez-Sala, B.** 2013. Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino: caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de *Lactobacillus curvatus* BCS35. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Goshorn, S. C., G. A. Bohach y P. M. Schlievert.** 1988. Cloning and characterization of the gene, *speC*, for pyrogenic exotoxin type C from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Gen. Genet.*, 212: 66-70.
- Gosink, K. K., E. R. Mann, C. Guglielmo, E. I. Tuomanen y H. R. Masure.** 2000. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 68: 5690-5695.
- Gould, G. W.** 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot.*, (Supl.): 82-86.
- Gravesen, A., P. Warthoe, S. Knochel y K. Thirstrup.** 2000. Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants show consistent overexpression of a putative β -glucoside-specific PTS system. *Microbiology*, 146: 2361-2369.
- Gravesen, A., K. Soresen, F. M. Aarestrup y S. Knoche.** 2001. Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. *Microb. Drug Resist.*, 7:127-135.
- Gravesen, A., A. M. J. Axelsen, J. M. da Silva, T. B. Hansen y S. Knøchel.** 2002a. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 756-764.
- Gravesen, A., M. Ramnath, K. B. Rechinger, N. Andersen, L. Jänsch, Y. Héchard, J. W. Hastings y S. Knøchel.** 2002b. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 148: 2361-2369.
- Gravesen, A., B. Kallipolitis, K. Holmstrøm, P. E. Højby, M. Ramnath y S. Knøchel.** 2004. *pbp2229*-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 1669-1679.
- Guarner, F., G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko y L. Morelli.** 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br. J. Nutr.*, 93: 783-786.
- Guarner, F., A. G. Khan, J. Garish, R. Eliakim, A. Gangl, A. Thomson, J. Krabshuis, T. Lemair, P. Kaufmann, J. A. de Paula, R. Fedorak, F. Shanahan, M. E. Sanders, H. Szajewska, B. S. Ramakrishna, T. Karakan y N. Kim; World Gastroenterology Organization.** 2012. World Gastroenterology Organization Global Guidelines: probiotics and probiotics October 2011. *J. Clin. Gastroenterol.*, 46: 468-481.
- Guder, A., I. Wiedemann y H. G. Sahl.** 2000. Posttranslationally modified bacteriocins: the lantibiotics. *Biopolymers (Peptide Sci.)*, 55: 62-73.
- Gueimonde, M., C. G. de los Reyes-Gavilán y B. Sánchez.** 2012. Stability of lactic acid bacteria in foods and supplements. En: "*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*", pp. 361-383,

4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.

Guglielmetti, S., V. Taverniti, M. Minuzzo, S. Arioli, M. Stuknyte, M. Karp y D. Mora. 2010. Oral bacteria as potential probiotics for the pharyngeal mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 3948-3958.

Guillot, J. F. 2003. Probiotic feed additives. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 26: 19-55.

Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross. 2005. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1316-1325.

Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross. 2006. Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lactacin 3147. *FEMS Microbiol. Lett.*, 260: 77-83.

Gutiérrez, J. 2005. Caracterización inmunoquímica de la enterocina P y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.

Gutiérrez, J., R. Criado, M. Martín, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández. 2005a. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 3004-3008.

Gutiérrez, J., D. Bourque, R. Criado, Y. J. Choi, L. M. Cintas, P. E. Hernández y C. B. Míguez. 2005b. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylophilic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 248: 125-131.

Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas y P. E. Hernández. 2005c. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, 103: 239-250.

Gutiérrez, J., R. Larsen, L. M. Cintas, J. Kok y P. E. Hernández. 2006. High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72: 41-51.

Hakenbeck, R., K. Kaminski, A. König, M. van der Linder, J. Paik, P. Reichmann y D. Zähner. 2000. Penicillin-binding proteins in β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. En: "Streptococcus pneumoniae. Molecular biology and mechanisms of disease", pp. 433-443. A. Tomasz (ed.). Mary Ann Liebert, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.

Hale, J. D., Y. T. Ting, R. W. Jack, J. R. Tagg y N. C. Heng. 2005. Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 7613-7617.

Halpern, M. T., J. K. Schmier, L. M. Snyder, C. Asche, P. W. Sarocco, B. Lavin, R. Nieman y L. A. Mandell. 2005. Meta-analysis of bacterial resistance to macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55: 748-757.

Hamza, A. A., E. I. El Gaali y A. A. Mahdi. 2009. Use of the RAPD-PCR fingerprinting and API system for clustering lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese sour milk (Roab). *African J. Biotechnol.*, 8: 3399-3404.

Han, X. Y., M. Kamana y K. V. Rolston. 2006. Viridans streptococci isolated by cultura from blood of cancer patients: clinical and microbiologic analysis of 50 cases. *J. Clin. Microbiol.*, 44: 160-165.

- Hancock, R. E. W. y D. S. Chapple.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 1317-1323.
- Hancock, R. E. W. y A. Rozek.** 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 206: 143-149.
- Hancock, R. E. W., T. Falla y M. Brown.** 1995. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 37: 135-175.
- Harris, L., M. A. Daeschel, M. E. Stiles y T. R. Klaenhammer.** 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 52: 384-387.
- Hartnett, D. J., A. Vaughan y D. van Sinderen.** 2002. Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.*, 108: 169-177.
- Hauge, H. H., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes y V. G. H. Eijsink.** 1998. Amphiphilic α -helices are important structural motifs in the α and β peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G. Enhancement of helix formation upon α - β interaction. *Eur. J. Biochem.*, 251: 565-572.
- Hausdorff, W. P., J. Bryant, C. Kloek, P. R. Paradiso y G. R. Siber.** 2000. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin. Infect. Dis.*, 30: 122-140.
- Hauser, A. R. y P. M. Schlievert.** 1990. Nucleotide sequence of the streptococcal pyrogenic exotoxin type B gene and relationship between the toxin and the streptococcal proteinase precursor. *J. Bacteriol.*, 172: 4536-4542.
- Håvarstein, L. S., H. Holo e I. F. Nes.** 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology*, 140: 2383-2389.
- Håvarstein, L. S., D. B. Diep e I. F. Nes.** 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.*, 16: 229-240.
- He, J., R. Eckert, T. Pharm, M. D. Simanian, C. Hu, D. K. Yarbrough, F. Qi, M. H. Anderson y W. Shi.** 2007. Novel synthetic antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51: 1351-1358.
- Healy, B., D. Field, P. M. O'Connor, C. Hill, P. D. Cotter y R. P. Ross.** 2013. Intensive mutagenesis of the nisin hinge leads to the rational design of enhanced derivatives. *PLoS One*, 8: e79563.
- Heavey, P. M. y I. R. Rowland.** 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Gastrointestinal cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 18: 323-336.
- Héchar, Y., C. Pelletier, Y. Cenatiempo y J. Frère.** 2001. Analysis of σ^{54} -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII^{Man}) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, 147: 1575-1580.
- Heikkinen, T. y T. Chonmaitree.** 2003. Importance of respiratory viruses in acute otitis media. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 230-241.
- Helander, I. M., A. von Wright y T. M. Mattila-Sandholm.** 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.*, 8: 146-150.
- Henderson, J. T., A. L. Chopko y P. D. Dyck van Wassenaar.** 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1·0. *Arch. Biochem. Biophys.*, 295: 5-12.

- Heng, N. C. K., G. A. Burtenshaw, R. W. Jack y J. R. Tagg.** 2007. Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 7763-7766.
- Henrichsen, J.** 1979. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. *J. Infect.*, 1: 31-37.
- Henrichsen, J.** 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2759-2762.
- Heraief, E., M. P. Glauser y L. R. Freedman.** 1982. Natural history of aortic-valve endocarditis in rats. *Infect. Immun.*, 37: 127-131.
- Hereu, A., S. Bover-Cid, M. Garriga y T. Aymerich.** 2012. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 154: 107-112.
- Hermans, P. W., P. V. Adrian, C. Albert, S. Estevão, T. Hoogenboezem, I. H. Luijendijk, T. Kamphausen y S. Hammerschmidt.** 2006. The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. *J. Biol. Chem.*, 281: 968-976.
- Herranz, C.** 2001. Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* de origen cárnico. Optimización de la producción y mecanismo molecular de acción de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Herranz, C. y A. J. M. Driessen.** 2005. Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1959-1963.
- Herranz, C., J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2001. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 378-383.
- Herranz, C., Y. Chen, H. J. Chung, L. M. Cintas, P. E. Hernández, T. J. Montville y M. L. Chikindas.** 2001. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1689-1692.
- Herrera, P., Y. M. Kwon y S. C. Ricke.** 2009. Ecology and pathogenicity of gastrointestinal *Streptococcus bovis*. *Anaerobe*, 15: 44-54.
- Hetz, C., M. R. Bono, L. F. Barros y R. Lagos.** 2002. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 2696-2701.
- Heu, S., J. Oh, Y. Kang, S. Ryu, S. K. Cho, Y. Cho y M. Cho.** 2001. *gly* gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4105-4110.
- Higgins, C. F.** 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Res. Microbiol.*, 152: 205-210.
- Hill, C. y T. O’Keeffe.** 2003. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of dairy sciences*”, pp. 129-135. Roginski, H., J. W. Fuqay y P. F. Fox (eds.). Academic Press, Bodmin, Reino Unido.

- Hiller, N. L., B. Janto, J. S. Hoggs, R. Boissy, S. Yu, E. Powell, R. Keefe, N. E. Ehrlich, K. Shen, J. Hayes, K. Barbadora, W. Klimke, D. Dernovoy, T. Tatusova, J. Parkhill, S. D. Bentley, J. C. Post, G. D. Ehrlich y F. Z. Hu. 2007. Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insights into the pneumococcal supragenome. *J. Bacteriol.*, 189: 8186-8195.
- Hidalgo-Grass, C., M. Ravins, M. Dan-Goor, J. Jaffe, A. E. Moses y E. Hanski. 2002. A locus of group A *Streptococcus* involved in invasive disease and DNA transfer. *Mol. Microbiol.*, 46: 87-99.
- Hillman, J. D., J. Novak, E. Sagura, J. A. Gutierrez, T. A. Brooks, P. J. Crowley, M. Hess, A. Azizi, K. Leung, D. Cvitkovitch y A. S. Bleiweis. 1998. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 66: 2743-2749.
- Hillman, J. D., T. A. Brooks, S. M. Michalek, C. C. Harmon, J. L. Snoep y C. C. van Der Weijden. 2000. Construction and characterization of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries. *Infect. Immun.*, 68: 543-549.
- Hinse, D., T. Vollmer, M. Erhard, M. Welker, E. R. B. Moore, K. Kleesiek y J. Dreier. 2011. Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equines*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses. *System. Appl. Microbiol.*, 34: 52-57.
- Hoffmann, J., M. S. Cetron, M. M. Farley, W. S. Baughman, R. R. Facklam, J. A. Elliot, K. A. Deaver y R. F. Breiman. 1995. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N. Engl. J. Med.*, 333: 481-486.
- Hollenbeck, B. y L. Rice. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in Enterococcus. *Virulence.*, 3: 421-433.
- Holo, H., O. Nissen y I. F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, 173: 3879-3887.
- Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S. Dusko Ehrlich, E. Guédon, V. Monnet, P. Renault y M. Kleerebezem. 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 435-463.
- Holtmark, I., V. G. H. Eijsink y M. B. Brurberg. 2008. Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 280: 1-7.
- Holzappel, W. H. y U. Schillinger. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.*, 35: 109-116.
- Holzappel, W. H., R. Geisen y U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 343-362.
- Holzappel, W. H., P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth y U. Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 365S-373S.
- Hoshino, T., T. Fujiwara y M. Kilian. 2005. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 6073-6085.
- Huang, T. T., H. Malke y J. J. Ferretti. 1989. Heterogeneity of the streptokinase gene in group A streptococci. *Infect. Immun.*, 57: 502-506.
- Hughenoltz, J., W. Sybesma, M. N. Groot, W. Wisselink, V. Ladero, K. Burgess, D. van Sinderen, J. C. Piard, G. Eggink, E. J. Smid, G. Savoy, F. Sesma, T. Jansen, P. Hols y M. Kleerebezem. 2002.

Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 217-235.

Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzapfel y C. M. Franz. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 730-739.

Hurst, A. 1981. Nisin. En: “*Advances in Applied Microbiology*, vol. 27”. Perlman, D. y A. I. Laskin (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.

Hurwitz, E. S., W. J. Gunn, P. F. Pinsky y L. B. Schonberger. 1991. Risk of respiratory illness associated with day-care attendance: a nationwide study. *Pediatrics*, 87: 62-69.

Hyink, O., A. P. Wescombe, M. Upton, M. Ragland, J. P. Burton y J. R. Tagg. 2007. Salivaricin A2 and a novel lantibiotic salivaricin B are encoded at adjacent loci on a 190-kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain *Streptococcus salivarius* K12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 1107-1113.

Hynes, W. L., J. J. Ferretti y J. R. Tagg. 1993. Cloning of the gene encoding Streptococcin A-FF22, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*, and determination of its nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1969-1971.

Iigen, C., J. Lin-Cereghino y J. M. Cregg. 2005. *Pichia pastoris*. En: “Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems”, pp. 143-162. G. Gellisen (ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim. Alemania.

Inoue, T., H. Tomita e Y. Ike. 2006. Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50: 1202-1212.

Ishiguro, T., N. Takayanagi, S. Yamaguchi, H. Yamakawa, K. Nakamoto, Y. Takaku, Y. Miyahara, N. Kagiya, K. Kurashima, T. Yanagisawa y Y. Sugita. 2013. Etiology and factors contributing to the severity and mortality of community-acquired pneumonia. *Intern. Med.*, 52: 317-324.

Ishihara K., K. Nakajima, S. Kishimoto, F. Atarashi, Y. Muramatsu, A. Hotta, S. Ishii, Y. Takeda, M. Kikuch y Y. Tamura. 2013. Distribution of antimicrobial-resistant lactic acid bacteria in natural cheese in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 57: 684-691.

Islam, B., S. N. Khan y A. U. Khan. 2007. Dental caries: from infection to prevention. *Med. Sci. Monit.*, 13: RA196-RA203.

Iwen, P. C., C. Mindru, A. C. Kalil y D. F. Florescu. 2012. *Pediococcus acidilactici* endocarditis successfully treated with daptomycin. *J. Clin. Microbiol.*, 50: 1106-1108.

Iyer, R., S. K. Tomar, T. U. Maheswari y R. Singh. 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 20: 133-141.

Jabrane, A., A. Sabri, P. Compère, P. Jacques, I. Vandenberghe, J. van Beeumen y P. Thonart. 2002. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5704-5710.

Jack, R. W., J. R. Tagg y B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59: 171-200.

Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch y E. Wollman. 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*, 84: 222-224.

- Jacobs, M. R.** 2004. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. *Am. J. Med.*, 117: 3S-15S.
- Jacobs, M. R., C. E. Good, B. Beall, S. Bajaksouzian, A. R. Windau y C. G. Whitney.** 2008a. Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 982-990.
- Jacobs, M. R., C. E. Good, S. Bajaksouzian y A. R. Windau.** 2008b. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19A, 6C and 22F and serogroup 15 in Cleveland, Ohio, in relation to introduction of the protein-conjugated pneumococcal vaccine. *Clin. Infect. Dis.*, 47: 1388-1395.
- Jacquet, T., C. Cailliez-Grimal, G. Francius, F. Borges, M. Imran, J. F. Duval y A. M. Revol-Junelles.** 2012. Antibacterial activity of class IIa bacteriocin Cbn BM1 depends on the physiological state of the target bacteria. *Res. Microbiol.*, 163 : 323-331.
- Janoff, E. N. y J. B. Rubins.** 1997. Invasive pneumococcal disease in the immunocompromised host. En: "Streptococcus pneumoniae. *Molecular biology and mechanisms of disease*", pp. 81-115. A. Tomasz (ed.). Mary Ann Liebert, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Jans, C., A. Gerber, J. Bugnard, P. M. Njage, C. Lacroix y L. Meile.** 2012a. Novel *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* variants harboring lactose metabolism genes homologous to *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol.* 31: 33-42.
- Jans, C., R. Follador, C. Lacroix, L. Meile y M. J. A. Stevens.** 2012b. Complete genome sequence of the African dairy isolate *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain CJ18. *J. Bacteriol.*, 194: 2105.
- Jans, C., D. W. M. Kaindi, D. Böck, P. M. K. Njage, S. M. Kouamé-Sina, B. Bonfoh, C. Lacroix y L. Meile.** 2013. Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *Int. J. Food Microbiol.*, 167: 186-195.
- Jans, C., L. Meile, C. Lacroix y M. J. Stevens.** 2015. Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infect. Genet. Evol.*, 33: 419-436.
- Jayamanne, V. S. y M. R. Adams.** 2006. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Lett. Appl. Microbiol.*, 42: 189-194.
- Jennes, W., L. M. T. Dicks y D. J. Verwoerd.** 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 349-357.
- Jensen, A., H. Fagö-Olsen, C. H. Sørensen y M. Kilian.** 2013. Molecular mapping to species level of the tonsillar crypt microbiota associated with health and recurrent tonsillitis. *PLoS One*, 8: e56418.
- Joerger, R. D.** 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Sci.*, 82: 640-647.
- Joerger, R. D., D. G. Hoover, S. F. Barefoot, K. M. Harmon, D. A. Grinstead y C. G. Nettles-Cutter.** 2000. Bacteriocins. En: "Encyclopedia of Microbiology", pp. 383-397, 2ª edición. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, San Diego, CA, EE.UU.
- Joffraud, J. J., F. Leroi, C. Roy y J. L. Berdagué.** 2001. Characterization of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.*, 66: 175-184.

- Johnsborg, O. y L. S. Håvarstein.** 2009. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 33: 627-642.
- Johnsen, L., G. Fimland, D. Mantzilas y J. Nissen-Meyer.** 2004. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2647-2652.
- Johnsen, L., G. Fimland y J. Nissen-Meyer.** 2005a. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.*, 280: 9243-9250.
- Johnsen, L., B. Dalhus, D. Mantzilas y J. Nissen-Meyer.** 2005b. 1.6-Å crystal structure of entA-im: a bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocin-like bacteriocin enterocin A. *J. Biol. Chem.*, 280: 19045-19050.
- Jonsson, S., D. M. Musher, A. Chapman, A. Goree y E. C. Lawrence.** 1985. Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J. Infect. Dis.*, 152: 4-13.
- Kabuki, T., H. Uenishi, M. Watanabe, Y. Seto y H. Nakajima.** 2007. Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 971-980.
- Kailasapathy, K.** 2013. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits—a review. *Int. J. Ferment. Foods*, 2: 1-17.
- Kalchayanand, N., M. B. Hanlin y B. Ray.** 1992. Sublethal injury makes gram-negative and resistant gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15: 239-243.
- Kalchayanand, N., A. Sikes, C. P. Dunne y B. Ray.** 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.*, 61: 425-431.
- Kalmokoff, M. L., F. Bartlett y R. M. Teather.** 1996. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? *J. Dairy Sci.*, 79: 2297-2306.
- Kamezawa, Y., T. Nakahara, S. Nakano, Y. Abe, J. Nozaki-Renard y T. Isono.** 1997. Streptococcal mitogenic exotoxin Z, a novel acidic superantigenic toxin produced by a T1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.*, 65: 3828-3833.
- Kang, J. H. y M. S. Lee.** 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1169-1176.
- Karapetkov, N., R. Georgieva, N. Rumyan y E. Karaivanova.** 2011. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. *Benef. Microbes*, 2: 335-339.
- Kauffmann, F., E. Lund y B. E. Eddy.** 1960. Proposal for a change in the nomenclature of *Diplococcus pneumoniae* and a comparison of the Danish and American type designations. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxom.*, 10: 31-40.
- Kawai, Y., R. Kemperman, J. Kok y T. Saito.** 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 5: 393-398.

- Kawamoto, S., J. Shima, R. Sato, T. Eguchi, S. Ohmomo, J. Shibato, N. Horikoshi, K. Takeshita y T. Sameshima.** 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3830-3840.
- Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura y T. Ezaki.** 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 406-408.
- Kawamura, Y., R. A. Whiley, S. E. Shu, T. Ezaki y J. M. Hardie.** 1999. Genetic approaches to the identification of the mitis group with the genus *Streptococcus*. *Microbiol.*, 145: 2605-2613.
- Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. Kuipers y J. Kok.** 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A y closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1589-1597.
- Khan, H., S. Flint y P. L. Yu.** 2010. Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 141: 1-10.
- Khan, M. N., S. K. Sharma, L. M. Filkins y M. E. Pichichero.** 2012. PcpA of *Streptococcus pneumoniae* mediates adherence to nasopharyngeal and lung epithelial cells and elicits functional antibodies in humans. *Microbes Infect.*, 14: 1102-1110.
- Kim, P. E., D. M. Musher, P. Glezen, M. C. Rodríguez-Barradas, W. K. Nahn y C. E. Wright.** 1996. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. *Clin. Infect. Dis.*, 22: 100-106.
- Kim, T. S., J. W. Hur, M. A. Yu, C. I. Cheigh, K. N. Kim, J. K. Hwng y Y. R. Pyun.** 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 66: 3-12.
- Kim, Y., S. K. Cho y M. Cho.** 2001. Improvemen in the stability of glycinecin A through protein fusion of the two structural components. *J. Microbiol.*, 39: 177-80.
- Kimura, K., J. Wachino, H. Kurokawa, M. Matsui, S. Suzuki, K. Yamane, N. Nagano, K. Shibayama y Y. Arakawa.** 2013. High cephalosporin resistance due to amino acid substitutions in PBP1A and PBP2X in a clinical isolate of group B *Streptococcus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 68: 1533-1536.
- Kittang, B. R., S. Skrede, N. Langeland, C. G. Haanshuus y H. Mylvaganam.** 2011. *emm* gene diversity, superantigen gene profiles and presence of SlaA among clinical isolates of group A, C and G streptococci from western Norway. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, 30: 423-133.
- Kjos, M., L. Snipen, Z. Salehian, I. F. Nes y D. B. Diep.** 2010. The abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J. Bacteriol.*, 192: 2068-2076.
- Kjos, M., I. F. Nes, y D. B. Diep.** 2011a. Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 3335-3342.
- Kjos, M., J. Borrero, M. Opsata, D. J. Birri, H. Holo, L. M. Cintas, L. Snipen, P. E. Hernández, I. F. Nes y D. B. Diep.** 2011b. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 157: 3256-3267.
- Kjos, M., C. Oppegård, D. B. Diep, I. F. Nes, J. W. Veening, J. Nissen-Meyer y T. Kristensen.** 2014. Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Mol. Microbiol.*, 92: 1177-1187.
- Klaenhammer, T. R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.

- Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-86.
- Kleerebezem, M. y L. E. Quadri.** 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*, 22: 1579-1596.
- Kleerebezem, M., L. E. N. Quadri, O. P. Kuipers y W. M. de Vos.** 1997a. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, 24: 895-904.
- Kleerebezem, M., M. M. Beerthuyzen, E. E. Vaughan, W. M. de Vos y O. P. Kuipers.** 1997b. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4581-4584.
- Klein, C. y K. D. Entian.** 1994. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2793-2801.
- Klein, G.** 2011. Antibiotic resistance and molecular characterization of probiotic and clinical *Lactobacillus* strains in relation to safety aspects of probiotics. *Foodborne Pathog. Dis.*, 8: 267-281.
- Klein, J. O.** 1999. Management of acute otitis media in an era of increasing antibiotic resistance. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 49: 15-17.
- Klugman, K. P.** 1990. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3: 171-196.
- Knerr, P. J. y W. A. van de Donk.** 2012. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu. Rev. Biochem.*, 81: 479-505.
- Knight, R. G. y D. M. Shlaes.** 1985. Physiological characteristics and deoxyribonucleic acid relatedness of human isolates of *Streptococcus bovis* and *Streptococcus bovis* (var.). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35:357-361.
- Kok, J., G. Buist, A. L. Zomer, S. A. F. T. van Hijum y O. P. Kuipers.** 2005. Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 411-433.
- Konisky, J.** 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.*, 36: 125-144.
- Könönen, E., H. Jousimies-Somer, A. Bryk, T. Kilp y M. Kilian.** 2002. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J. Med. Microbiol.*, 51: 723-730.
- Koornhof, H. J., A. Wasas y K. P. Klugman.** 1992. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: A South African perspective. *Clin. Infect. Dis.*, 15: 84-94.
- Kostic, A. D., M. R. Howitt y W. S. Garrett.** 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev.*, 27: 701-718.
- Krachler, A. M. y K. Orth.** 2013. Made to Stick: Anti-Adhesion Therapy for Bacterial Infections. *Microbe.*, 8: 286-290.
- Kramer, N. E.** 2005. Nisin resistance in Gram-positive bacteria. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Kramer, N. E., S. A. F. T. van Hijum, J. Knol, J. Kok y O. P. Kuipers.** 2006. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50: 1753-1761.

- Kristinsson, K. G.** 2000. Effect of antimicrobial use and other risk factors on antimicrobial resistance in pneumococci. En: "Streptococcus pneumoniae. *Molecular biology and mechanisms of disease*", pp. 419-427. A. Tomasz (ed.). Mary Ann Liebert, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. de Ruyter, E. J. Luesink y W. M. de Vos.** 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 270: 27299-27304.
- Ladero, V., M. Calles-Enríquez, M. Fernández y M. A. Álvarez.** 2010. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Curr. Nutr. Food Sci.*, 6: 145-156.
- Lagos, R., M. Tello, G. Mercado, V. García y O. Monasterio.** 2009. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10: 74-85.
- Laible, G., B. G. Spratt y R. Hakenbeck.** 1991. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 5: 1993-2002.
- Lal, D., M. Verma y R. Lal.** 2011. Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 10: 28.
- Lancefield, R. C.** 1933. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. *J. Exp. Med.*, 59: 441-158.
- Lancefield, R. C.** 1940. Type-specific antigens, M and T, or matt and glossy variants of group A haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 47:91-103.
- LaPenta, D., X. P. Zhang y P. P. Cleary.** 1994. *Streptococcus pyogenes* type IIa IgG Fc receptor expression is co-ordinately regulated with M protein and streptococcal C5a peptidase. *Mol. Microbiol.*, 12: 873-879.
- Larsen, A. G. y B. Nørrung.** 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.*, 17: 132-134.
- Lauková, A. y S. Czikková.** 1998. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 215-218.
- Lauková, A., S. Czikková, Z. Vasilková, P. Juris e I. Krupicer.** 1998. Antimicrobial effect of enterocin CCM 4231 in the cattle slurry environment. *Cytobios*, 94: 73-79.
- Lauková, A., P. Juriš, Z. Vasilková e I. Papajová.** 2000. Treatment of sanitary-important bacteria by bacteriocin substance V24 in cattle dung water. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30: 402-405.
- Lawton, E. M., R. P. Ross, C. Hill y P. D. Cotter.** 2007. Two-peptide lantibiotics: a medical perspective. *Mini Rev. Med. Chem.*, 7: 1236-1247.
- Lazarevic, V., S. Manzano, N. Gaïa, M. Girard, K. Whiteson, J. Hibbs, P. François, A. Gervais y J. Schrenzel.** 2013. Effects of amoxicillin treatment on the salivary microbiota in children with acute otitis media. *Clin. Microbiol. Infect.*, 19: E335-42.
- Leclercq, R.** 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 482-492.
- Leclercq, R., C. Huet, M. Picherot, P. Trieu-Cuot y C. Poyart.** 2005. Genetic basis of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus gallolyticus* (*Streptococcus bovis*). *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 49: 1646-1648.

- Lee, H. y H. Y. Kim.** 2011. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 229-235.
- Lee, H. J., S. K. Park, K. Y. Choi, S. E. Park, Y. M. Chun, K. S. Kim, S. N. Park, Y. S. Cho, Y. J. Kim y H. J. Kim, Korean Otologic Society.** 2012. Korean clinical practice guidelines: otitis media in children. *J. Korean Med. Sci.*, 27: 835-848.
- Leer, R., J. van der Vossen, M. van Giesen, H. van Noort y P. Pouwels.** 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*, 141: 1629-1635.
- Leistner, L.** 1992. Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.*, 25: 151-158.
- Leistner, L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.*, 55: 181-186.
- Leistner, L. y L. G. M. Gorris.** 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.*, 6: 41-46.
- Leroy, F. y L. de Vuyst.** 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 15: 67-78.
- Leroy, F., J. Verluyten y L. de Vuyst.** 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 106: 270-285.
- Lewin, B.** 2004. The *Sec* system transports proteins into and through the inner membrane. En: "*Genes VIII*", pp. 221-222. Carlson, G. y J. Challice (eds). Pearson Education, Inc., New Jersey, NJ, EE.UU.
- Li, P., A. Anumanthan, X. G. Gao, K. Ilangovan, V. V. Suzara, N. Düzgünes y V. Renugopalakrishnan.** 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142: 105-124.
- Li, R., M. Y. Chowdhury, J. H. Kim, P. Pathinayake, W. S. Koo, M. E. Park, J. E. Yoon, J. B. Roh, S. P. Hong, M. H. Sung, J. S. Lee y C. J. Kim.** 2015. Mucosally administered *Lactobacillus* surface-displayed influenza antigens (sM2 and HA2) with cholera toxin subunit A1 (CTA1) induce broadly protective immune responses against divergent influenza subtypes. *Vet. Microbiol.*, 179: 250-263.
- Lin, S. H., S. Miyata, W. Weng, W. Matsunaga, J. Ichikawa, K. Furuya, T. Nakashima, T. Kiyohara, O. P. Kuipers, P. G. G. A de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos.** 1998. Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, 64: 15-21.
- Linden, P. K.** 2007. Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 28: 632-45.
- Linder, T., R. Dandiles, D. Lime y T. de María.** 1994. Effect of intranasal inoculation of *Streptococcus pneumoniae* on the structure of the surface carbohydrates of the chinchilla eustachian tube and middle ear mucosa. *Microb. Pathog.*, 16: 435-441.
- Line, J. E., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, B. S. Seal, G. R. Siragusa y N. J. Stern.** 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52: 1094-1100.
- Liñares, J., C. Ardanuy, R. Pallares y A. Fenoll.** 2010. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16: 402-410.

- Liu, G., J. Zhong, J. Ni, M. Chen, H. Xiao y L. Huan.** 2009. Characteristics of the bovicin HJ50 gene cluster in *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*, 155: 584-593.
- Liu, L. C., J. C. Tsai, P. R. Hsueh, S. P. Tseng, W. C. Hung, H. J. Chen y L. J. Teng.** 2008. Identification of tet(S) gene area in tetracycline-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 61: 453-455.
- Liu, M. J., R. J. Siezen y A. Nauta.** 2009. In silico prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals protooperation in yogurt manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 4120-4129.
- Lohans, C. T. y J. C. Vederas.** 2012. Development of Class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int. J. Microbiol.*, 2012: 386410.
- Lohner, K. y E. J. Prenner.** 1999. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biophys. Acta*, 1462: 141-156.
- Lombardi, A., M. Gatti, L. Rizzotti, S. Torriani, C. Andrighetto y G. Giraffa.** 2004. Characterization of *Streptococcus macedonicus* strain isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. *Int. Dairy J.*, 14: 967-976.
- Lopardo, H. A., P. Vidal, M. Sparo, P. Jeric, D. Centron, R. R. Facklam, H. Paganini, N. G. Pagniez, M. Lovgren y B. Beall.** 2005. Six-month multicenter study on invasive infections due to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Argentina. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 802-807.
- Lorca, G., L. Reddy, A. Nguyen, E. I. Sun, J. Tseng, M. R. Yen y M. H. Saier.** 2010. Lactic acid bacteria: comparative genomic analyses of transport systems. En: "*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*", pp. 73-87, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Lore, T. A., S. K. Mbugua y J. Wangoh.** 2005. Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Food Sci. Technol.*, 38: 125-130.
- Lubianca Neto, J. F., L. Hemb y D. B. Silva.** 2006. Systematic literature review of modifiable risk factors for recurrent acute otitis media in childhood. *J. Pediatr. (Rio J)*. 82: 87-96.
- Lücke, F. K.** 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.*, 56: 105-115.
- Lüders, T., G. A. Birkemo, G. Fimland, J. Nilssen-Meyer e I. F. Nes.** 2003. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1797-1799.
- Lund, B., C. Edlund, B. Rynnel-Dagöö, Y. Lundgren, J. Sterner y C. E. Nord.** 2001. Ecological effects on the oro- and nasopharyngeal microflora in children after treatment of acute otitis media with cefuroxime axetil or amoxicillin-clavulanate as suspensions. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7: 230-237.
- Lund, E.** 1960. Laboratory diagnosis of pneumococcus infections. *Bull Wld. Hlth. Org.*, 23: 5-13.
- Lund, E.** 1970. On the nomenclature of the pneumococcal types. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20: 321-323.
- Lux, T., M. Nuhn, R. Hakenbeck y P. Reichmann.** 2007. Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 189: 7741-7751.

- Lyhs, U., H. Korkeala, P. Vandamme y J. Björkroth.** 2001. *Lactobacillus alimentarius*—a specific spoilage organism in marinated herring. *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 355-360.
- Lyhs, U. y J. Björkroth.** 2008. *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiol.*, 25: 529-533.
- Maischberger, T., I. Mierau, C. K. Peterbauer, J. Hugenholtz y D. Haltrich.** 2010. High-level expression of *Lactobacillus* beta-galactosidases in *Lactococcus lactis* using the food-grade, nisin-controlled expression system NICE. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 2279-2287.
- Makrides, S. C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 60: 512-538.
- Malke, H., B. Roe y J. J. Ferretti.** 1985. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene*, 34: 357-362.
- Mandell, L. A., R. G. Wunderink, A. Anzueto, J. G. Bartlett, G. D. Campbell, N. C. Dean, S. F. Dowell, T. M. File, D. M. Musher, M. S. Niederman, A. Torres y C. G. Whitney.** 2007. Infectious diseases society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community acquired pneumonia in adults. *Clin. Infect. Dis.*, 2: 27-72.
- Mantovani, H. C. y J. B. Russell.** 2002. The ability of a bacteriocin of *Streptococcus bovis* HC5 (bovicin HC5) to inhibit *Clostridium aminophilum*, an obligate amino acid fermenting bacterium from the rumen. *Anaerobe*, 8: 247-252.
- Maqueda, M., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M. J. Sánchez-Barrena, C. González, A. Albert, M. Rico y E. Valdivia.** 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 5: 399-416.
- Maqueda, M., M. Sánchez-Hidalgo, M. Fernández, M. Montalbán-López, E. Valdivia y M. Martínez Bueno.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 2-22.
- Maragkoudakis, P. A., M. Papadelli, M. Georgalaki, E. G. Panayotopoulou, B. Martínez-González, A. F. Mentis, K. Petraki, D. N. Sgouras y E. Tsakalidou.** 2009. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Int. J. Food Microbiol.*, 133: 141-147.
- March, C., J. J. Manclús, A. Abad, A. Navarro y A. Montoya.** 2005. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *J. Immunol. Methods*, 303: 92-104.
- Marciset, O., M. C. Jeronimus-Stratingh, B. Mollet y B. Poolman.** 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, 272:14277-14284.
- Marks, L. R., E. A. Clementi y A. P. Hakansson.** 2013. Sensitization of *Staphylococcus aureus* to methicillin and other antibiotics *in vitro* and *in vivo* in the presence of HAMLET. *PLoS One*, 8: e63158.
- Marra, A., S. Lawson, J. S. Asundi, D. Brigham y A. E. Hromockyj.** 2002. *In vivo* characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology*, 148: 1483-1491.
- Marriott, H. M., T. J. Mitchell y D. H. Dockrell.** 2008. Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr. Mol. Med.*, 8: 497-509.

- Martín, C., C. Sibold y R. Hakenbeck.** 1992. Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *EMBO J.*, 11: 1831-1836.
- Martín, M.** 2006. Identificación y evaluación de la expresión de genes que codifican bacteriocinas y detección de factores potenciales de virulencia de enterococos aislados de palomas torcaces (*Columba palumbus*). Caracterización bioquímica y genética de la columbicina A de *Enterococcus columbae* PLCH2 y construcción de quimeras génicas que permiten la producción y expresión funcional de la enterocina A y la pediocina PA-1 y su coproducción con la nisina A en cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007a. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76: 667-675.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007b. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food Prot.*, 70: 2792-2798.
- Martín, N. I. y E. Breukink.** 2007. Expanding role of lipid II as a target for lantibiotics. *Future Microbiol.*, 2: 513-525.
- Martín, R.** 2005. Origen y potencial probiótico de la microbiota de la leche humana. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Martín-Platero, A. M., E. Valdivia, M. Ruiz-Rodríguez, J. J. Soler, M. Martín-Vivaldi, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 4245-4249.
- Martínez, B. y A. Rodríguez.** 2005. Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 252: 67-72.
- Martínez, B., T. Böttiger, T. Schneider, A. Rodríguez, H. G. Sahl e I. Wiedemann.** 2008. Specific interaction of the unmodified bacteriocin Lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 4666-4670.
- Martínez, B., A. Rodríguez y J. E. Suárez.** 2000a. Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology*, 146: 949-955.
- Martínez, M. I., J. M. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez y J. M. Rodríguez.** 2000b. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 2. Modo de acción, biosíntesis, aplicaciones y tendencias futuras. *Alimentaria*, 314: 67-74.
- Martínez-Bueno, M., M. Maqueda, A. Gálvez, B. Samyn, J. van Beeumen, J. Coyette y E. Valdivia.** 1994. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.*, 176: 6334-6339.
- Martínez-Cuesta, M. C., J. Kok, E. Herranz, C. Peláez, T. Requena y G. Buist.** 2000. Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3174-3179.
- Martínez-Cuesta, M. C., T. Requena y C. Peláez.** 2001. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.*, 70: 79-88.

- Marugg, J. D., C. F. Gonzalez, B. S. Kunka, A. M. Ledebøer, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. M. Zoetmulder y P. A. Vandenberg.** 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2360-2367.
- Mataragas, M., E. H. Drosinos, E. Tsakalidou y J. Metaxopoulos.** 2004. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85: 191-198.
- Mathara, J. M., U. Schillinger, P. M. Kutima, S. K. Mbugua y W. H. Holzapfel.** 2004. Isolation, identification and characterization of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 269-278.
- Mathot, A. G., E. Beliard y D. Thuault.** 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *J. Dairy Sci.*, 86: 3068-3074.
- Matsuzaki, K.** 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1462: 1-10.
- Maxted, W. R.** 1949. Occurrence of the M. substance of type 28 group A in streptococci of Lancefield groups B, C, and G. *J. Gen. Microbiol.*, 3: 1-6.
- Mayville, P. G. J., R. Beavis, H. Yang, M. Goger, R. P. Novick y T. W. Muir.** 1999. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 1218-23.
- Mazotta, A. S., y T. J. Montville.** 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *Can. J. Appl. Microbiol.*, 82: 32-38.
- McCormick, J. K., R. W. Worobo y M. E. Stiles.** 1996. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4095-4099.
- McCormick, J. K., A. Poon, M. Sailer, Y. Gao, K. L. Roy, L. M. McMullen, J. C. Vederas, M. E. Stiles y M. J. van Belkum.** 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4757-4766.
- McCullers, J. A., Å. Karlström, A. R. Iverson, J. M. Loeffler y V. A. Fischetti.** 2007. Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.*, 3:e28.
- McFarland, L. V.** 2015. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 60: 85-90.
- McGee, L., K. P. Klugman, D. Friedland y H. Lee.** 1997. Spread of the Spanish multi-resistant serotype 23F clone of *Streptococcus pneumoniae* to Seoul, Korea. *Microb. Drug Resist.*, 3: 253-257.
- McGee, L., K. P. Klugman y A. Tomasz.** 2000. Serotypes and clones of antibiotic-resistant pneumococci. En: "Streptococcus pneumoniae. Molecular biology and mechanisms of disease", pp. 375-381. A. Tomasz (ed.). Mary Ann Liebert, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- McGee, L., L. McDougal, J. Zhou, B. G. Spratt, F. C. Tenover, R. George, R. Hankenbeck, W. Hryniewicz, J. C. Lefèvre, A. Tomasz y K. P. Klugman.** 2001. Nomenclature of major antimicrobial-

resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by pneumococcal molecular epidemiology network. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 2565-2571.

McIver, K. S. y J. R. Scott. 1997. Role of *mga* in growth phase regulation of virulence genes of the group A streptococcus. *J. Bacteriol.*, 179: 5178-5187.

McIver, K. S., A. S. Heath, B. D. Green y J. R. Scott. 1995. Specific binding of the activator Mga to promoter sequences of the *emm* and *scpA* genes in the group A streptococcus. *J. Bacteriol.* 177: 6619-6624.

McMullen, L. M. y M. E. Stiles. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot. (Suppl.)*: 64-71.

Mehla, J. y S. K. Sood. 2011. Substantiation in *Enterococcus faecalis* of dose-dependent resistance and cross-resistance to pore-forming antimicrobial peptides by use of a polydiacetylene-based colorimetric assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 786-793.

Mehr, S. y N. Wood. 2012. *Streptococcus pneumoniae*-a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatr. Respir. Rev.*, 13: 258-264.

Melo, M. N., R. Ferre y M. A. Castanho. 2009. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7: 245-250.

Messaoudi, S., G. Kergourlay, M. Dalgalarondo, Y. Choiset, M. Ferchichi, H. Prévost, M. F. Pilet, J. M. Chobert, M. Manai y X. Dousset. 2012. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.*, 32: 129-134.

Messens, W. y L. de Vuyst. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 72: 31-43.

Metlitskaya, A., T. Kazakov, A. Kommer, O. Pavlova, M. Praetorius-Ibba, M. Ibba, I. Krasheninnikov, V. Kolb, I. Khmel y K. Severinov. 2006. Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin C. *J. Biol. Chem.*, 281: 18033-18042.

Mevius, D., L. Devriese, P. Butaye, P. Vandamme, M. Verschure y K. Veldman. 1998. Isolation of glycopeptide resistant *Streptococcus gallolyticus* strains with *vanA*, *vanB*, and both *vanA* and *vanB* genotypes from faecal samples of veal calves in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42: 275-276.

Meyer, K. y M. M. Rapport. 1952. Hyaluronidases. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, 13: 199-236.

Michel-Briand Y. y C. Baysse. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84: 499-510.

Mierau, I. y M. Kleerebezem. 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68: 705-717.

Mierau, I., P. Leji, I. van Swam, B. Blommestein, E. Floris, J. Mond y E. J. Smid. 2005. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin. *Microb. Cell Fact.*, 4:15.

Mindich, L. 1966. Bacteriocins of *Diplococcus pneumoniae*. I. Antagonistic relationships and genetic transformations. *J. Bacteriol.*, 92:1090-1098.

Ming, X., y M. A. Daeschel. 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott-A. *J. Food Prot.*, 56: 944-948.

- Mirza, S., L. Wilson, W. H. Jr. Benjamin, J. Novak, S. Barnes, S. K. Hollingshead y D. E. Briles.** 2011. Serine protease PrtA from *Streptococcus pneumoniae* plays a role in the killing of *S. pneumoniae* by apolactoferrin. *Infect. Immun.*, 79: 2440-2450.
- Mitchell, A. M. y T. J. Mitchell.** 2010. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16: 411-418.
- Modi, K. D., M. L. Chikindas y T. J. Montville.** 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30: 249-253.
- Mofredj, A., H. Bahloul y C. Chanut.** 2007. *Lactococcus lactis*: an opportunistic bacterium? *Med. Mal. Infect.*, 37: 200-207.
- Mogesen, G., S. Salminen, J. O'Brien, A. Ouwehand, W. Holzapfel, C. Shortt, R. Fonden, G. Miller, D. Donohue, M. Playne, R. Crittenden, B. Bianchi Salvadori y R. Zink.** 2002a. Food microorganisms—health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bulletin of IDF.*, 377: 4-9.
- Mogesen, G., S. Salminen, J. O'Brien, A. Ouwehand, W. Holzapfel, C. Shortt, R. Fonden, G. Miller, D. Donohue, M. Playne, R. Crittenden, B. Bianchi Salvadori y R. Zink.** 2002b. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bulletin of IDF.*, 377: 10-19.
- Moll, G. N., W. N. Konings y A. J. M. Driessen.** 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 185-198.
- Molloy, E. M., R. P. Ross y C. Hill.** 2012. “Bac” to the future: bioengineering lantibiotics for designer purposes. *Biochem. Soc. Trans.*, 40: 1492-1497.
- Montalbán-López, M., M. Sánchez-Hidalgo, E. Valdivia, M. Martínez-Bueno y M. Maqueda.** 2011. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 12: 1205-1220.
- Montville, T. J. y M. E. C. Bruno.** 1994. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 53-74.
- Montville, T. J. e Y. Chen.** 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 511-519.
- Morello, E., L. G. Bermúdez-Humarán, D. Llull, V. Solé, N. Miraglio, P. Langella y I. Poquet.** 2008. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 48-58.
- Moreno, M. R. F., J. J. Leisner, L. K. Tee, C. Ley, S. Radu, G. Rusul, M. Vancanneyt y L. de Vuyst.** 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 147-157.
- Mori, H. y K. Ito.** 2001. The Sec protein-translocation Pathway. *Trends Microbiol.*, 9: 494-500.
- Moscoso, M., E. García y R. López.** 2009. Pneumococcal biofilms. *Int. Microbiol.*, 12: 77-85.
- Mota-Meira, M., C. Lacroix, G. LaPointe y M. C. Lavoie.** 1997. Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett.*, 410:275-279.
- Mukisa, I. M., D. Porcellato, Y. B. Byaruhanga, C. M. Muyanja, T. Langsrud y J. A. Navhus.** 2012. The dominant microbial community associated with fermentation of Obushera (sorghum and millet

- beverages) determined by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 160: 1-10.
- Mulet-Powell, N., A. M. Lacoste-Armynot, M. Viñas y M. S. de Buochberg.** 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 61: 1210-1212.
- Muller, A., H. Ulm, K. Reder-Christ, H. G. Sahl y T. Schneider.** 2012. Interaction of type A lantibiotics with undecaprenol-bound cell envelope precursors. *Microb. Drug Resist.*, 18: 261-270.
- Munch, D., A. Muller, T. Schneider, B. Kohl, M. Wenzel, J. E. Bandow, S. Maffioli, M. Sosio, S. Donadio, R. Wimmer y H. G. Sahl.** 2014. The lantibiotic NAI-107 binds to bactoprenol bound cell wall precursors and impairs membrane functions. *J. Biol. Chem.*, 289: 12063-12076.
- Muñoz-Atienza, E.** 2015. Caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas de origen acuático como probióticos para el cultivo de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Muñoz-Atienza, E., G. Landeta, B. de las Rivas, B. Gómez-Sala, R. Muñoz, P. E. Hernández, L. M. Cintas y C. Herranz.** 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 146: 212-216.
- Muñoz-Atienza, E., B. Gómez-Sala, C. Araújo, C. Campanero, R. del Campo, P. E. Hernández, C. Herranz y L. M. Cintas.** 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.*, 13: 15.
- Muñoz, R., T. J. Coffey, M. Daniels, C. G. Dowson, G. Laible, J. Casal, R. Hakenbeck, M. Jacobs, J. M. Musser, B. G. Spratt, et al.** 1991. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.*, 164: 302-306.
- Musher, D. M.** 1992. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment [Review]. *Clin. Infect. Dis.*, 14: 801-807.
- Musher, D. M., R. F. Breiman y A. Tomasz.** 2000. *Streptococcus pneumoniae*: at the threshold of the 21st century. En: "Streptococcus pneumoniae. Molecular biology and mechanisms of disease", pp. 485-493. A. Tomasz (ed.). Mary Ann Liebert, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Nagao, J., S. M. Asaduzzaman, Y. Aso, K. Okuda, J. Nakayama y K. Sonomoto.** 2006. Lantibiotics: insight and foresight for the new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.*, 102: 139-149.
- Naghmouchi, K., E. Kheadr, C. Lacroix e I. Fliss.** 2007. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 24: 718-727.
- Nagpal, R., A. Kumar, P. V. Behare, S. Jain y H. Yadav.** 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol. Lett.*, 334: 1-15.
- Nandiwada, L. S., G. P. Schamberger, H. W. Schafer y F. Diez-Gonzalez.** 2004. Characterization of an E2-type colicin and its application to treat alfalfa seeds to reduce *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.*, 93: 267-279.
- Natale, P., T. Brüsser y A. J. Driessen.** 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane: distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778: 1735-1756.

- Ndaw, A., A. Zinedine, M. Faid y A. Bouseta.** 2008. Effect of controlled lactic acid bacterial fermentation on the microbiological and chemical qualities of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 55: 295-310.
- Neetoo, H., M. Ye y H. Chen.** 2007. Effectiveness and stability of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 70: 1267-1271.
- Nelms, C. F., D. A. Odelson, T. R. Whitehead y R. B. Hespell.** 1995. Differentiation of ruminal and human *Streptococcus bovis* strains by DNA homology and 16s rRNA probes. *Curr. Microbiol.*, 31:294-300.
- Nelson, A. L., A. M. Roche, J. M. Gould, K. Chim, A. J. Ratner y J. N. Weiser.** 2007. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.*, 75: 83-90.
- Nes, I. F. y V. G. H. Eijsink.** 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. En: "*Cell-Cell Signaling in Bacteria*", pp. 175-192. Dunny, G. M. y S. C. Winans (eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, EE. UU.
- Nes, I. F. y H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Pept. Sci.)*, 55: 50-61.
- Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge y J. Nissen-Meyer.** 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. En: "*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*", pp. 81-115. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, EE. UU.
- Nes, I. F. y O. Johnsborg.** 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15: 100-104.
- Nes, I. F., D. B. Diep y H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189: 1189-1198.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havårstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink y H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 113-128.
- Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge y J. Nissen-Meyer.** 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. En: "*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*", pp. 81-115. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Nes, I. F., M. Kjos y D. B. Diep.** 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria. En: "*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*", pp. 285-329, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE. UU.
- Nettles, C. G. y S. F. Barefoot.** 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, 56: 338-356.
- Netz, D. J. A., H. G. Sahl, R. Marcolino, J. dos Santos-Nascimento, S. S. de Oliveira, M. B. Soares y M. C. F. Bastos.** 2001. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.*, 311: 939-949.
- Netz, D. J. A., R. Pohl, A. G. Beck-Sickinger, T. Selmer, A. J. Pierik, M. C. F. Bastos y H. G. Sahl.** 2002. Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.*, 319: 745-756.

- Ng, D. T. y C. A. Sarkar.** 2013. Engineering signal peptides for enhanced protein secretion from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 347-356.
- Nguyen, H. A., T. Tomita, M. Hirota, J. Kaneko, T. Hayashi e Y. Kamio.** 2001. DNA inversion in the tail fiber gene alters the host range specificity of carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin of phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. *J. Bacteriol.*, 183: 6274-6281.
- Nicolas, G., H. Morency, G. LaPointe y M. C. Lavoie.** 2006. Mutacin H-29B is identical to mutacin II (J-T8). *BCM Microbiol.*, 6: 36.
- Nicolas, G. G., G. LaPointe y M. C. Lavoie.** 2011. Production, purification, sequencing and activity spectra of mutacins D-123.1 and F-59.1. *BMC Microbiol.*, 11: 69.
- Nilsen, T., I. F. Nes y H. Holo.** 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.*, 180: 1848-1854.
- Nilsen, T., I. F. Nes y H. Holo.** 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2975-2984.
- Nishie, M., J. I. Nagao y K. Sonomoto.** 2012. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.*, 17: 1-16.
- Nissen-Meyer, J. e I. F. Nes.** 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.*, 167: 67-77.
- Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Håvarstein, K. Sletten e I. F. Nes.** 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, 174: 5686-5692.
- Nissen-Meyer, J., L. S. Håvarstein, H. Holo, K. Sletten y I. F. Nes.** 1993. Association of the lactococcal immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J. Gen Microbiol.*, 139: 1503-1509.
- Nissen-Meyer, J., P. Rogne, C. Oppegård, H. S. Haugen y P. E. Kristiansen.** 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10: 19-37.
- Nissen-Meyer, J., C. Oppegård, P. Rogne, H. S. Haugen y P. E. Kristiansen.** 2010. Structure and mode of action of the two-peptide (Class IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2: 52-60.
- Nobbs, A. H., R. J. Lamont y H. F. Jenkinson.** 2009. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73: 407-450.
- Norrby-Teglund, A., D. Newton, M. Kotb, S. E. Holm y M. Norgren.** 1994. Superantigenic properties of the group A streptococcal exotoxin SpeF (MF). *Infect. Immun.*, 62: 5227-5233.
- O'Connor, E. M. y R. F. Shand.** 2002. Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 23-31.
- O'Connor, E. B., B. O'Riordan, S. M. Morgan, H. Whelton, D. M. O'Mullane, R. P. Ross y C. Hill.** 2006. A lacticin 3147 enriched food ingredient reduces *Streptococcus mutans* isolated from the human oral cavity in saliva. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 1251-1260.
- O'Keeffe, T. y C. Hill.** 2000. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of food microbiology*”, pp. 183-191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.

- O’Keeffe, T., C. Hill y R. P. Ross.** 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1506-1515.
- O’Sullivan, L., R. P. Ross y C. Hill.** 2002a. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.*, 84: 593-604.
- O’Sullivan, L., S. M. Morgan, R. P. Ross y C. Hill.** 2002b. Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lactacin 481, produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. *J. Dairy Sci.*, 85: 2130-2140.
- Oelschlaeger, T. A.** 2010. Mechanisms of probiotic actions—a review. *Int. J. Med. Microbiol.*, 300: 57-62.
- Ogier, J. C. y P. Serror.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 291-301.
- Ogier, J. C., E. Casalta, C. Farrokh y A. Saihi.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 286-290.
- Ogunniyi, A. D., M. Grabowicz, L. K. Mahdi, J. Cook, D. L. Gordon, T. A. Sadlon y J. C. Paton.** 2009. Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn²⁺-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB J.*, 23: 731-738.
- Ojcius, D. M. y J. D. Young.** 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem. Sci.*, 16: 225-229.
- Okwumabua, O., M. O’Connor y E. Shull.** 2003. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218:79-84.
- Olasupo, N. A., U. Schillinger, C. M. A. P. Franz y W. H. Holzapfel.** 1994. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from “wara”-a fermented skimmed cow milk product from west Africa. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19: 438-441.
- Oppegård, C., P. R. Linda-Emanuelson, P. E. Kristiansen, G. Fimland y J. Nissen-Meyer.** 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13: 210-219.
- Osawa, R., T. Fujisawa y L. I. Sly.** 1995. *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *System. Appl. Microbiol.*, 18:74-78.
- Oumer, A., P. Gaya, E. Fernández-García, R. Marciana, S. Garde, M. Medina y M. Núñez.** 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.*, 68: 117-129.
- Pacini, F., D. Cariolato, C. Andrighetto y A. Lombardi.** 2006. Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. *FEMS Microbiol. Lett.*, 261: 69-73.
- Paetzel, M., A. Karla, N. C. Strynadka y R. E. Dalbey.** 2002. Signal peptidases. *Chem. Rev.*, 102: 4549-4580.
- Pag, U. y H. G. Sahl.** 2002a. Lanthionine-containing bacterial peptides. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 47-80. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.

- Pag, U. y H. G. Sahl.** 2002b. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics? *Curr. Pharm. Des.*, 8: 815-33.
- Pallares, R., F. Gudiol, J. Liñares, J. Ariza, G. Rufi, L. Murqui, J. Dorca y P. F. Viladrich.** 1987. Risk factors and response to antibiotic therapy in adults with bacteremic pneumonia caused by penicillin-resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.*, 317: 18-22.
- Pallares, R., P. F. Viladrich, J. Liñares, C. Cabellos y F. Gudiol.** 2000. Impact of antibiotic resistance on chemotherapy for pneumococcal infections. En: "Streptococcus pneumoniae. *Molecular biology and mechanisms of disease*", pp. 409-419. A. Tomasz (ed.). Mary Ann Liebert, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Palmieri, C., I. M. Rättsch, M. S. Princivalli, C. Candelaresi, G. Magi, C. Spinaci, G. V. Coppa y B. Facinelli.** 2007. *erm(A)*-mediated macrolide resistance and ability to invade human respiratory cells in a *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* pharyngeal isolate. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60: 1405-1406.
- Papadimitriou, K., R. Anastasiou, E. Mavrogonatou, J. Blom, N. C. Papandreou, S. J. Hamodrakas, S. Ferreira, P. Renault, P. Supply, B. Pot y E. Tsakalidou.** 2014. Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equines* complex. *BMC Genomics*, 15: 272.
- Papagianni, M.** 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21: 465-499.
- Parente, E. y C. Hill.** 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *E. faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 55: 497-502.
- Park, K. Y y B. K. Kim.** 2012. Lactic Acid Bacteria in vegetable fermentations. En: "*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*", pp. 187-211, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Park, I. H., D. G. Pritchard, R. Cartee, A. Brandao, M. C. Brandileone y M. H. Nahm.** 2007. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 1225-1233.
- Parker, D., G. Soong, P. Planet, J. Brower, A. J. Ratner y A. Prince.** 2009. The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect. Immun.*, 77: 3722-3730.
- Parks, W. M., A. R. Bottrill, O. A. Pierrat, M. C. Durrant y A. Maxwell.** 2007. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*. 89: 500-507.
- Parret, A. y R. de Mot.** 2000. Novel bacteriocins with predicted tRNase and pore-forming activities in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.*, 35: 472-473.
- Patterson, M. J.** 1996. *Streptococcus*. En "Medical Microbiology", capítulo 13. Baron S. (ed). Galveston (TX), University of Texas Medical Branch, Galveston.
- Peláez, C. y T. Requena.** 2005. Exploiting the potential of bacteria in cheese ecosystem. *Int. Dairy J.*, 15: 831-844.
- Pérez, N.** 2012. A review on some chemical engineering and microbiological aspects considered in the production of highly concentrated probiotic cultures and bacteriocins by lactococci and lactobacilli. *ISRN Chemical Engineering*, Article ID 836381 doi:10.5402/2012/836381.

- Petersen, F. C., G. Fimland y A. A. Scheie.** 2006. Purification and functional studies of a potent modified quorum-sensing peptide and a two-peptide bacteriocin in *Streptococcus mutans*. *Mol. Microbiol.*, 61: 1322-1334.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud.** 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71: 525-541.
- Pinho, M. D., J. Melo-Cristino y M. Ramirez.** 2010. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and evidence for a shared global gene pool with *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54: 1769-1777.
- Piper, C., P. D. Cotter, R. P. Ross y C. Hill.** 2009a. Discovery of medically significant lantibiotics. *Curr. Drug Discov. Technol.*, 6: 1-18.
- Piper, C., L. A. Draper, P. D. Cotter, R. P. Ross y C. Hill.** 2009b. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J. Antimicrob. Chemother.*, 64: 546-551.
- Plano, G. V., J. B. Day y F. Ferracci.** 2001. Type III export: new uses for an old pathway. *Mol. Microbiol.*, 40: 284-293.
- Pons, A. M., I. Lanneluc, G. Cottenceau y S. Sable.** 2002. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, 84: 531-537.
- Post, J. C., R. A. Preston, J. J. Aul, M. Larkins-Pettigrew, J. Rydquist-White, K. W. Anderson, R. M. Wadowsky, D. R. Reagan, E. S. Walker, L. A. Kingsley, A. E. Magit y G. D. Ehrlich.** 1995. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA*, 273: 1598-1604.
- Postma, D. F., C. H. van Werkhoven, S. M. Huijts, M. Bolkenbaas, J. J. Oosterheert y M. J. Bonten.** 2012. New trends in the prevention and management of community-acquired pneumonia. *Neth. J. Med.*, 70: 337-348.
- Pot, B., W. Ludwig, K. Kersters y K. H. Schleifer.** 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. En: "Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics and applications", pp. 13-90. de Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds). Blackie Academic & Professional, Reino Unido.
- Poyart, C., C. Pierre, G. Quesne, B. Pron, P. Berche y P. Trieu-Cuot.** 1997. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 41: 24-29.
- Poyart, C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche y P. Trieu-Cuot.** 1998. Identification of Streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 41-47.
- Poyart, C., G. Quesne y P. Trieu-Cuot.** 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependant superoxide dismutase gene (*SodA*) sequences : reclassification of *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* as *Streptococcus lutetienses* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52 : 1247-1255.
- Pracht D., C. Elm, J. Gerber, S. Bergmann, M. Rohde, M. Seiler, K. S. Kim, H. F. Jenkinson, R. Nau y S. Hammerschmidt.** 2005. PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect. Immun.*, 73: 2680-2689.
- Prajapati, J. B., N. M. Nathani, A. K. Patel, S. Senan y C. G. Joshi.** 2013. Genomic analysis of dairy starter cultura *Streptococcus thermophilus* MTCC5461. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 459-466.

- Prieto, J., A. Calvo y M. L. Gómez-Lus.** 2002. Antimicrobial resistance: a class effect? *J. Antimicrob. Chemother.*, 50: 7-12.
- Proft, T., S. L. Moffatt, C. J. Berkahn y J. D. Fraser.** 1999. Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J. Exp. Med.*, 189: 89-102.
- Proft, T., P. D. Webb, V. Handley y J. D. Fraser.** 2003. Two novel superantigens found in both group A and group C *Streptococcus*. *Infect. Immun.*, 71: 1361-1369.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 57: 50-108.
- Pukatzki, S., A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg y J. J. Mekalanos.** 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 1528-1533.
- Qi, F., P. Chen y P. W. Caufield.** 1999. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3880-3887.
- Qi, F., P. Chen y P. W. Caufield.** 2000. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3221-3229.
- Qi, F., P. Chen y P. W. Caufield.** 2001. The group I strain of *Streptococcus mutans* UA140 produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 15-21.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.*, 269: 12204-12211.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, M. R. Terebiznik, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.*, 177: 1144-1151.
- Quadri, L. E. N., L. Z. Yan, M. E. Stiles y J. C. Vederas.** 1997a. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. Overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 272: 3384-3388.
- Quadri, L. E. N., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, W. M. de Vos, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1997b. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.*, 179: 6163-6171.
- Ramnath, M., M. Beukes, K. Tamura y J. W. Hastings.** 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3098-3101.
- Ramnath, M., S. Arous, A. Gravesen, J. W. Hastings e Y. Héchard.** 2004. Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 150: 2663-2668.
- Rasch, M. y S. Knöchel.** 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27: 275-278.

- Rashid, Md. H., K. Togo, M. Ueda, and T. Miyamoto.** 2009. Characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* J2 40-2 isolated from traditional fermented milk "Dahi". *Anim. Sci. J.*, 80: 70-78.
- Ray, B., R. Schamber y K. W. Miller.** 1999. The pediocin AcH precursor is biologically active. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2281-2286.
- Recio, I., y R. López-Fandiño.** 2005. Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud. En: "Alimentos funcionales". Juárez, M., A. Olano y F. Morais (eds). Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología. Madrid.
- Reda, K. B., V. Kapur, J. A. Mollick, J. G. Lamphear, J. M. Musser y R. R. Rich.** 1994. Molecular characterization and phylogenetic distribution of the streptococcal superantigen gene (ssa) from *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.*, 62: 1867-1874.
- Reddy, K. V., C. Aranha, S. M. Gupta y R. D. Yedery.** 2004. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reproduction*, 128: 117-126.
- Reglinski, M. y S. Sriskandan.** 2014. The contribution of group A streptococcal virulence determinants to the pathogenesis of sepsis. *Virulence*, 5: 127-136.
- Reinert, R. R., M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, S. Bajaksouzian, S. Cordeiro, M. van der Linden y A. Al-Lahham.** 2005. Relationship between the original multiply resistant South African isolates of *Streptococcus pneumoniae* from 1977 to 1978 and contemporary international resistant clones. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 6035-6041.
- Reinert, R. R., P. Paradiso y B. Fritzell.** 2010. Advances in pneumococcal vaccines: the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. *Expert. Rev. Vaccines*, 9: 229-236.
- Rekhif, N., A. Atrih y G. Lefebvre.** 1994. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiol.*, 28: 237-241.
- Ren, B., A. J. Szalai, O. Thomas, S. K. Hollingshead y D. E. Briles.** 2003. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 71: 75-85.
- Richard, C., R. Cañon, K. Naghmouchi, D. Bertrand, H. Prévost y D. Drider.** 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.*, 23: 175-183.
- Rightmier, E., V. Stevens y J. Brown.** 2011. *Streptococcus pneumoniae* vaccination in older adults. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.*, 9: 392-404.
- Rihakova, J., V. W. Petit, K. Demnerova, H. Prevost, S. Rebuffat y D. Drider.** 2009. Insights into structure-activity relationships in the C-terminal region of divercin V41, a class IIa bacteriocin with high-level antilisterial activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 1811-1819.
- Riley, M. A. y J. E. Wertz.** 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 117-137.
- Rincé, A., A. Dufour, P. Uguen, J. P. Le Pennec y D. Haras.** 1997. Characterization of the lactacin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes *lctF*, *lctE*, and *lctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4252-4260.

- Ring, A., J. Weiser y E. Tuomanen.** 1998. Pneumococcal trafficking across the blood brain barrier. *J. Clin. Invest.*, 102: 1-14.
- Risøen, P. A., L. S. Håvarstein, D. B. Diep e I. F. Nes.** 1998. Identification of the DNA-binding sites of two response regulators involved in control of bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Gen. Genet.*, 259: 224-232.
- Risøen, P. A., M. B. Brurberg, V. G. H. Eijsink e I. F. Nes.** 2000. Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.*, 37: 619-628.
- Rizzotti, L., F. La Gioia, F. Dellaglio y S. Torriani.** 2009. Characterization of tetracycline-resistant *Streptococcus thermophilus* isolates from Italian soft cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 4224-4229.
- Robichon, D., E. Gouin, M. Débarbouillé, P. Cossart, Y. Cenatiempo e Y. Héchard.** 1997. The *rpoN* ($\sigma 54$) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.*, 179: 7591-7594.
- Robson, C. L., P. A. Wescombe, N. A. Klesse y J. R. Tagg.** 2007. Isolation and partial characterization of the *Streptococcus mutans* type AII lantibiotic mutacin K8. *Microbiology*, 153: 1631-1641.
- Rodgers, S.** 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 12: 276-284.
- Rodgers, S., K. Kailasapathy, J. Cox y P. Peiris.** 2002. Bacteriocin production by protective cultures. *Food Service Technol.*, 2: 59-68.
- Rodgers, G. L., A. Arguedas, R. Cohen y R. Dagan.** 2009. Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 27: 3802-3810.
- Ross, K. F., C. W. Ronson y J. R. Tagg.** 1993. Isolation and characterization of the lantibiotic Salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2014-2021.
- Ross R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twommey, W. J. Meaney y C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 337-346.
- Ross, R. P., S. Morgan y C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.*, 79: 3-16.
- Rusch, S. L. y D. A. Kendall.** 2007. Oligomeric states of the SecA and SecYEG core components of the bacterial Sec translocon. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768: 5-12.
- Ruseler-van Embden, J. G. H., L. M. C. Lieshout-van, M. J. Gosselink y P. Marteau.** 1995. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand. J. Gastroenterol.*, 30: 675-680.
- Rusniok, C., E. Couvé, V. Da Cunha, R. El Gana, N. Zidane, C. Bouchier, C. Poyart, R. Leclercq, P. Trieu-Cuot y P. Glaser.** 2010. Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. *J. Bacteriol.*, 192: 2266-2276.
- Russell, H., R. R. Facklam, J. F. Padula y R. Cooksey.** 1972. Capillary precipitin typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 8: 355-359.

- Ryan, M. P., M. C. Rea, C. Hill y R. P. Ross.** 1996. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 612-619.
- Ryan M.P., W. J. Meaney, R. P. Ross y C. Hill.** 1998. Evaluation of lacticin 3147 and teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2287-2290.
- Ryan, M. P., J. Flynn, C. Hill, R. P. Ross y W. J. Meaney.** 1999. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 82: 2625-2631.
- Ryan, M. P., C. Hill y R. P. Ross.** 2002. Exploitation of lantibiotic peptides for food and medical uses. En: "*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*", pp. 193-242. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö y T. Mattila-Sandholm.** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 84: 197-215.
- Saavedra, J. M., N. A. Bauman, I. Oung, J. A. Perman y R. H. Yolken.** 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*, 344: 1046-1049.
- Sablon, E., B. Contreras y E. Vandamme.** 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 68: 21-60.
- Sachse, S., P. Seidel, D. Gerlach, E. Günther, J. Rödel, E. Straube y K. H. Schmidt.** 2002. Superantigen-like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: genomic localization of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (speG [dys]). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 34: 159-167.
- Sahl, H. G. y G. Bierbaum.** 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52: 41-79.
- Sakamoto, K. y W. N. Konings.** 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.*, 89: 105-124.
- Salminen, M. K., H. Rautelin, S. Tynkkynen, T. Poussa, M. Saxelin, V. Valtonen y A. Jarvinen.** 2006. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clin. Infect. Dis.*, 42: e35-c44.
- Salminen, S. y A. von Wright.** 2012. Probiotics: safety and efficacy. En: "*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*", pp. 509-524, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Salminen, S., E. Isolauri y E. Salminen.** 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 347-358.
- Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fondén, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland y T. Mattila-Sandholm.** 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 44: 93-106.
- Salovaara, H. y M. Gänzle.** 2012. Lactic acid bacteria in cereal-based products. En: "*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*", pp. 227-245, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.

- Samelis, J., A. Kakouri y J. Rementzis.** 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiol.*, 17: 329-340.
- Sánchez, J.** 2008. Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de enterococos aislados de ánades reales (*Anas platyrhynchos*). Caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.*, 117: 295-305.
- Sánchez, J., J. Borrero, B. Gómez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2008. Cloning and heterologous production of Hiracin JM79 a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 2471-2479.
- Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno.** 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1633-1641.
- Sanders, M. E., L. M. Akkermans, D. Haller, C. Hammerman, J. Heimbach, G. Hörmannspenger, G. Huys, D. D. Levy, F. Lutgendorff, D. Mack, P. Phothirath, G. Solano-Aguilar y E. Vaughan.** 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.*, 1: 164-185.
- Saucier, L., A. S. Paradkar, L. S. Frost, S. E. Jensen y M. E. Stiles** 1997. Transcriptional analysis and regulation of carnobacteriocin production in *Carnobacterium piscicola* LV17. *Gene*, 188: 271-277.
- Savini, V., M. Favaro, C. Fontana, N. P. Consilvio, A. Manna, M. Talia, C. Catavittello, A. Balbinot, F. Febbo, G. Di Bonaventura, N. Di Giuseppe y D. D'Antonio.** 2008. A case of pharyngitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.*, 57: 674-675.
- Scannell, A. G. M., C. Hill, R. P. Ross, S. Marx, W. Hartmeier y E. K. Arendt.** 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin®. *Int. J. Food Microbiol.*, 60: 241-249.
- Schillinger, U., R. Geisen y W. H. Holzapfel.** 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 7: 158-164.
- Schirrmeister, J. F., A. L. Liebenow, K. Pelz, A. Wittmer, A. Serr, E. Hellwig y A. Al-Ahmad.** 2009. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J. Endod.*, 35: 169-174.
- Schlegel, L., F. Grimont, F. Collins, M. D. Regnault, P. A. Grimont y A. Bouvet.** 2000. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 1425-1434.
- Schelegel, L., F. Grimont, E. Ageron, P. A. Grimont y A. Bouvet.** 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equines* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 631-645.

- Schlegel, L., F. Grimont, P. A. Grimont, y A. Bouvet. 2004. New group D streptococcal species. *Indian. J. Med. Res.* 119: 252-256.
- Schmidt, J. W., A. Greenough, M. Burns, A. E. Luteran y D. G. McCafferty. 2010. Generation of ramoplanin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 310: 104-111.
- Schneider, E. y S. Hunke. 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22: 1-20.
- Schoeman, H., M. A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks e I. S. Pretorius. 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15: 647-656.
- Schuerman, L., D. Borys, B. Hoet, A. Forsgren y R. Prymula. 2009. Prevention of otitis media: now a reality? *Vaccine*, 27: 5748-5754.
- Sebban-Kreuzer, C., P. Deprez-Beauclair, A. Berton y I. Crenon. 2006. High-level expression of nonglycosylated human pancreatic lipase-related protein 2 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*: 49: 284-291.
- Settani, L. y G. Moschetti. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.*, 27: 691-697.
- Severina, E., A. Severina y A. Tomasz. 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41: 341-347.
- Shaikh, F., P. Abhinand y P. Ragunath. 2012. Identification and characterization of *Lactobacillus salavarius* bacteriocins and its relevance in cancer therapeutics. *Bioinformation*, 8: 589-594.
- Sherman, J. M. 1937. The streptococci. *Bacteriol. Rev.*, 1: 3-97.
- Shi, S. H., W. T. Yang, G. L. Yang, Y. L. Cong, H. B. Huang, Q. Wang, R. P. Cai, L. P. Ye, J. T. Hu, J. Y. Zhou, C. F. Wang e Y. Li. 2014. Immunoprotection against influenza virus H9N2 by the oral administration of recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 expressing hemagglutinin in BALB/c mice. *Virology*, 464-465: 166-176.
- Shibasaki, S., M. Karasaki, S. Tafuku, W. Aoki, T. Sewaki y M. Ueda. 2014. Oral immunization against candidiasis using *Lactobacillus casei* displaying enolase 1 from *Candida albicans*. *Sci. Pharm.*, 82: 697-708.
- Shottmuller, H. 1903. Die Artunterscheidung der fur den menschen Pathogen Streptokokken durch Blutagar. *Munch. Med. Wochenschr.*, 50:849-853.
- Shuangquan, B. y T. Miyamoto. 2004. Microflora in traditional fermented camel's milk from Inner Mongolia, China. *Milchwissenschaft*, 59: 649-652.
- Siezen, R. J., O. P. Kuipers y W. M. de Vos. 1996. Comparison of the lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 171-184.
- Silkin, L., S. Hamza, S. Kaufman, S. L. Cobb y J. C. Vederas. 2008. Spermicidal bacteriocins: lacticin 3147 and subtilisin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18: 3103-3106.
- Silla, M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 29:213-231.
- Sillanpää, J., S. R. Nallapareddy, K. V. Singh, M. J. Ferraro y B. E. Murray. 2008. Adherence characteristics of endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* ssp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* biotype I) isolates to host extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 289: 104-109.

- Sillanpää, J., S. R. Nallapareddy, X. Qin, K. V. Singh, D. M. Muzny, C. L. Kovar, L. V. Nazareth, R. A. Gibbs, M. J. Ferraro, J. M. Steckelberg, G. M. Weinstock y B. E. Murray.** 2009. A collagen-binding adhesin, Acb, and ten other putative MSCRAMM and pilus family proteins of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* Group, biotype I). *J. Bacteriol.*, 191: 6643-6653.
- Skaugen, M., L. M. Cintas e I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. En: "*Genetics of lactic acid bacteria*", pp. 225-260. Wood, B. J. B. y P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, NY, EE.UU.
- Sim, A. C., W. Lin, G. K. Tan, M. S. Sim, V. T. Chow y S. Alonso.** 2008. Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine*, 26: 1145-54.
- Siragusa, G. R., C. N. Cutter y J. L. Willett.** 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol.*, 16: 229-235.
- Siró, I., E. Kápolna, B. Kápolna y A. Lugasi.** 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—a review. *Appetite*, 51: 456-467.
- Sit, C. S. y J. C. Vederas.** 2008. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem. Cell Biol.*, 86: 116-123.
- Smit, G., B. A. Smit y W. J. M. Engels.** 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 591-610.
- Smith, L. y J. D. Hillman.** 2008. Therapeutic potential of type A (I) lantibiotics, a group of cationic peptide antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11: 401-408.
- Soriano, F. y V. Rodríguez-Cerrato.** 2002. Pharmacodynamic and kinetic basis for the selection of pneumococcal resistance in the upper respiratory tract. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50: 51-58.
- Sparo, M. D., D. G. Jones y S. F. Sánchez Bruni.** 2009. Assessment of the *in vitro* efficacy of the novel antimicrobial peptide CECT7121 against human gram-positive bacteria from serious infections refractory to treatment. *Chemotherapy*, 55: 270-277.
- Sperstad, S. V., T. Haug, H. M. Blencke, O. B. Styrvold, C. Li y K. Stensvåg.** 2011. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnol. Adv.*, 29: 519-530.
- Sprules, T., K. E. Kawulka y J. C. Vederas.** 2004. NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry*, 43: 11740-11749.
- Stein, T., S. Heinzmann, S. Düsterhus, S. Borchert y K. D. Entian.** 2005. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J. Bacteriol.*, 187: 822-828.
- Steiner, K. y H. Malke.** 2002. Dual control of streptokinase and streptolysin S production by the covRS and fasCAX two-component regulators in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Infect. Immun.*, 70: 3627-3636.
- Stevens, H. C. y L. O'Brien Nabors.** 2009. Microbial food cultures: a regulatory update. *Food Technol.*, 63: 36-41.

- Stevens, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes y T. R. Klaenhammer.** 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3613-3615.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
- Stiles, M. E. y W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36: 1-29.
- Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J. T. Tsay, P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam y L. A. Birkenberger.** 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190: 55-62.
- Stewart, P. S. y J. W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358: 135-138.
- Straume, D., M. Kjos, I. F. Nes y D. B. Diep.** 2007. Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. *Mol. Genet. Genomics*, 278: 283-293.
- Sun, Z., J. Zhong, X. Liang, J. Liu, X. Chen y L. Huan.** 2009. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 1964-1973.
- Suzuki, N., M. Seki, Y. Nakano, Y. Kiyoura, M. Maeno e Y. Yamashita.** 2005. Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridans group streptococci by genomic subtractive hybridation. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 4528-4534.
- Suzuki, N., M. Yuyama, S. Maeda, H. Ogawa, K. Mashiko y Y. Kiyoura.** 2006. Genotypic identification of presumptive *Streptococcus pneumoniae* by PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.*, 55: 709-714.
- Suzzi, G. y F. Gardini.** 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 88:41-54.
- Švec, P., A. Ševčíková, I. Sedláček, J. Bednářová, C. Snauwaert, K. Lefebvre, P. Vandamme y M. Vancanneyt.** 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from human blood cultures. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 49: 192-196.
- Svetoch, E. A., B. V. Eruslanov, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. N. Borzenkov, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, Y. N. Kovalev, Y. G. Stepanshin, G. R. Siragusa, B. S. Seal y N. J. Stern.** 2008. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 1942-1948.
- Swe, P. M., N. C. K. Heng, Y. T. Ting, H. J. Baird, A. Carne, A. Tauch, J. R. Tagg y R. W. Jack.** 2007. *efl097* and *ypkK* encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 153: 3218-3227.
- Tabata, A., K. Nakano, K. Ohkura, T. Tomoyasu, K. Kikuchi, R. A. Whiley y H. Nagamune.** 2013. Novel twin streptolysin S-like peptides encoded in the sag operon homologue of beta-hemolytic *Streptococcus anginosus*. *J. Bacteriol.*, 195: 1090-1099.
- Tagg, J. R.** 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-streptococcus pyogenes bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J. Med. Res.*, 119: 13-16.

- Tagg, J. R., R. S. D. Read y A. R. McGiven.** 1971. Bacteriocine production by group A streptococci. *Pathology*, 3: 277-278.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani y L.W. Wanamaker.** 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Tagg, J. R., C. N. Chilcott y J. P. Burton:** US20060171901 (2006).
- Tamine, A. Y.** 2002. Microbiology of starter cultures. En: “*Dairy Microbiology Handbook*”, 3ª edición. Robinson, R. K. (ed.). Wiley Interscience, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Tarahomjoo, S.** 2012. Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria. *Mol. Biotechnol.*, 51: 183-199.
- Ten Brink, B., C. Damink, H. M. L. J. Joosten y J. H. J. Huis in't Veld.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 11:73-84.
- Ten Brink, B., M. Minekus, J. M. van der Vossen, R. J. Leer y J. H. Huis in't Veld.** 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 140-148.
- Teng, L. J., P. R. Hsueh, S. W. Ho y K. T. Luh.** 2001. High prevalence of inducible erythromycin resistance among *Streptococcus bovis* isolates in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 45: 3362-3365.
- Thompson, C. C., V. E. Emmel, E. L. Fonseca, M. A. Marin y A. C. P. Vicente.** 2013. Streptococcal taxonomy based on genome sequence analyses. *F1000 Res.*, 2: 67.
- Tiwari, B. K., V. P. Valdramidis, C. P. O'Donnell, K. Muthukumarappan, P. Bourke y P. J. Cullen.** 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 5987-6000.
- Todorov, S. D.** 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action. *Braz. J. Microbiol.*, 40: 209-221.
- Todorov, S. D. y L. M. T. Dicks.** 2005. Characterisation of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.*, 45: 312-322.
- Todorov, S. D., M. B. Wachsman, H. Knoetze, M. Meincken y L. M. T. Dicks.** 2005. An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25: 508-513.
- Todorov, S. D., M. Wachsman, E. Tomé, X. Dousset, M. T. Destro, L. M. Dicks, B. D. Franco, M. Vaz-Velho y D. Drider.** 2010. Characterization of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food. Microbiol.*, 27: 869-879.
- Tong, H. H, L. E. Blue, M. A. James y T. F. DeMaria.** 2000. Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect. Immun.*, 68: 921-924.
- Tooley, K. L., G. S. Howarth, K. A. Lymn, A. Lawrence y R. N. Butler.** 2006. Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol. Ther.*, 5: 593-600.
- Torri Tarelli, G., D. Carminati y G. Giraffa.** 1994. Production of bacteriocin active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a dairy enterococci. *Food Microbiol.*, 11: 243-252.

- Trautner, B. W., R. A. Hull y R. O. Darouiche.** 2005. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56: 413-415.
- Tsai, C. T., C. Y. Chi, C. M. Ho, P. C. Lin, C. H. Chou, J. H. Wang, J. H. Wang, H. C. Lin, N. Tien, K. H. Lin, M. W. Ho y J. J. Lu.** 2014. Correlation of virulence genes to clinical manifestations and outcome in patients with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* bacteremia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 47: 462-468.
- Tuomanen, E.** 1999. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 35-39.
- Twomey, D. P., A. I. Wheelock, J. Flynn, W. J. Meaney, C. Hill y R. P. Ross.** 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lactacin 3147. *J. Dairy Sci.*, 83: 1981-1988.
- Twomey, D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney y C. Hill.** 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.
- Työppönen, S., E. Petäjä y T. Mattila-Sandholm.** 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 83: 233-244.
- Uh, Y., D. H. Shin, I. H. Jang, G. Y. Hwang, M. K. Lee, K. J. Yoon y H. Y. Kim.** 2004. Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of viridians group streptococci from blood cultures in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53: 1095-1097.
- Urueña, A., T. Pippo, M. S. Betelu, F. Virgilio, N. Giglio, A. Gentile, S. García Jiménez, B. Jáuregui, A. D. Clark, M. Diosque y C. Vizzotti.** 2011. Cost-effectiveness analysis of the 10- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines in Argentina. *Vaccine*, 29: 4963-4972.
- Uzelac, G., M. Kojic, J. Lozo, T. Aleksandrak-Piekarczyk, C. Gabrielsen, T. Kristensen, I. F. Nes, D. B. Diep y L. Topisirovic.** 2013. A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. *J. Bacteriol.*, 195: 5614-5621.
- Vacca-Smith, A. M., C. A. Jones, M. J. Levine y M. W. Stinson.** 1994. Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.*, 62: 2187-2194.
- Vadyvaloo, V., J. W. Hastings, M. J. van der Merwe y M. Rautenbach.** 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5223-5230.
- Vadyvaloo, V., J. L. Snoep, J. W. Hastings y M. Rautenbach.** 2004a. Physiological implication of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150: 335-340.
- Vadyvaloo, V., S. Arous, A. Gravesen, Y. Hechard, R. Chauchan-Haubrock, J. W. Hastings y M. Rautenbach.** 2004b. Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150: 3025-3033.
- Van Asselt, G. J., J. S. Vliegenthart, J. A. van de Klundert y R. P. Mouton.** 1992. High-level aminoglycoside resistance among enterococci and group A streptococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, 30: 651-659.
- Van Bambeke, F., R. R. Reinert, P. C. Appelbaum, P. M. Tulkens y W. E. Peetermans.** 2007. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections. Current and future therapeutic options. *Drugs*, 67: 2355-2382.

- Van Belkum, M. J. y M. E. Stiles.** 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3573-3579.
- Van Belkum, M. J. y M. E. Stiles.** 2000. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 17: 323-325.
- Van Belkum, M. J., J. Kok y G. Venema.** 1992. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 572-579.
- Van der Ploeg, J. R.** 2005. Regulation of bacteriocins production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. *J. Bacteriol.*, 187: 3980-3989.
- Van der Poll, T. y S. M. Opal.** 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374: 1543-1556.
- Van Reenen C. A. y L. M. Dicks.** 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Arch. Microbiol.*, 193: 157-168.
- Van Roosmalen, M. L., N. Geukens, J. D. Jongbloed, H. Tjalsma, J. Y. Dubois, S. Bron, J. M. van Dijl y J. Anné.** 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1694: 279-297.
- Van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl y A. J. M. Driessen.** 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 437-454.
- Varaldo, P. E., M. P. Montanari y E. Giovanetti.** 2009. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 343-353.
- Varella-Coelho, M. L., J. dos Santos-Nascimento, P. C. Fagundes, D. J. Madureira, S. S. Oliveira, M. A. Vasconcelos y M. C. F. Bastos.** 2007. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Sptreptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res. Microbiol.*, 158: 625-630.
- Vaughan, A., V. G. Eijsink y D. Van Sinderen.** 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 7194-7203.
- Vaughan, A., S. Rouse y D. van Sinderen.** 2004. Investigating the antimicrobial efficacy of a lactococcal bacteriocin for the development of microbiologically stable beer. *J. Inst. Brew.*, 110: 181-188.
- Venema, K., R. E. Haverkort, T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, L. de Leij, G. Venema y J. Kok.** 1994. Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol. Microbiol.*, 14: 521-532.
- Vermeiren, L., F. Devlieghere y J. Debevere.** 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 96: 149-164.
- Vidal, J. E., H. P. Ludewick, R. M. Kundel, D. Zähler y K. P. Klugman.** 2011. The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strain D39. *Infect. Immun.*, 79: 4050-4060.
- Vilcinskas, A., K. Mukherjee y H. Vogel.** 2013. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proc. Biol. Sci.*, 280: 20122113.

- Villena, J., M. Medina, S. Racedo y S. Álvarez.** 2010. Resistance of young mice to pneumococcal infection can be improved by oral vaccination with recombinant *Lactococcus lactis*. *J. Microbial. Immunol. Infect.*, 43: 1-10.
- Vincent, P. A. y R. D. Morero.** 2009. The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. *Curr. Med. Chem.*, 16: 538-549.
- Vincent, S. J., E. J. Faber, J. R. Neeser, F. Stingle y J. P. Kamerling.** 2001. Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. *Glycobiology*, 11: 131-139.
- Von Wright, A. y L. Axelsson.** 2012. Lactic acid bacteria: an introduction. En: "*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*", pp. 1-16, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Wachsmann, M. B., V. Castilla, A. P. de Ruiz Holgado, R. A. de Torres, F. Sesma y C. E. Coto.** 2003. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication *in vitro*. *Antiviral Res.*, 58: 17-24.
- Wald, E. R., N. Guerra y C. Byers.** 1991. Upper respiratory tract infections in young children: duration of and frequency of complications. *Pediatrics*, 87: 129-133.
- Walls, T., D. Power y J. Tagg.** 2003. Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by the normal flora of the nasopharynx: potential to protect against otitis media? *J. Med. Microbiol.*, 52: 829-833.
- Wan, J., K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, J. B. Gordon, A. Wilcock, M. W. Hickey y M. J. Coventry.** 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J. Appl. Microbiol.*, 82: 273-280.
- Wandersman, C.** 1998. Protein and peptide secretion by ABC exporters. *Res. Microbiol.*, 149: 163-170.
- Wang, C. Y. C., H. S. Shie, S. C. Chen, J. P. Huang, I. C. Hsieh, M. S. Wen, F. C. Lin y D. Wu.** 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *Int. J. Clin. Pract.*, 61: 68-73.
- Wang, H., C. L. Brook, A. L. Whittaker, A. Lawrence, R. Yazbeck y G. S. Howarth.** 2013. Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 in a rat model of doxorubicin-induced mucositis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 48: 959-968.
- Webster, J., E. Theodoratou, H. Nair, A. C. Seong, L. Zgaga, T. Huda, H. L. Johnson, S. Madhi, C. Rubens, J. S. F. Zhang, S. El Arifeen, R. Krause, T. A. Jacobs, A. W. Brooks, H. Campbell y I. Rudan.** 2011. An evaluation of emerging vaccines for childhood pneumococcal pneumonia. *BMC Public Health*, 11: S26.
- Weeks, C. R. y J. J. Ferretti.** 1986. Nucleotide sequence of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage T12. *Infect. Immun.*, 52: 144-150.
- Weil-Olivier, C., M. van der Linden, I. de Schutter, R. Dagan y L. Mantovani.** 2012. Prevention of pneumococcal disease in the post-seven valent vaccine era: A European perspective. *BMC Infect. Dis.*, 12: 207.
- Wells, J.** 2011. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2: 423-445.

- Wells, J. M. y A. Mercenier.** 2003. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles. En: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 261-315. Wood, B. J. B. y P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, NY, EE.UU.
- Werner, G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe, E. Sadowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J. Willems, W. Witte y N. Woodford.** 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.*, 13: 19046.
- Wescombe, P. A., y J. R. Tagg.** 2003. Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2737-2747.
- Wescombe, P. A., M. Upton, K. P. Dierksen, N. L. Ragland, S. Sivabalan, R. E. Wirawan, M. A. Inglis, C. J. Moore, G. V. Walker, C. N. Chilcott, H. F. Jenkinson y J. R. Tagg.** 2006. Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:1459-1466.
- Wescombe, P. A., N. CK. Heng, J. P. Burton, C. N. Chilcott y J. R. Tagg.** 2009. Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Microbiol.*, 4: 819-835.
- Wescombe, P. A., M. Upton, P. Renaul, R. E. Wirawan, D. Power, J. P. Burton, C. N. Chilcott y J. R. Tagg.** 2011. Salivaricin 9, a new lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius*. *Microbiology*, 157:1290-1299.
- Wescombe, P. A., K. H. Dyet, K. P. Dierksen, D. A. Power, R. W. Jack, J. P. Burton, M. A. Inglis, A. L. Wescombe y J. R. Tagg.** 2012a. Salivaricin G32, a homolog of the prototype *Streptococcus pyogenes* nisin-like lantibiotic SA-FF22, produced by the commensal species *Streptococcus salivarius*. *Int. J. Microbiol.*, 2012: 738503. doi: 10.1155/2012/738503.
- Wescombe, P. A., J. D. Hale, N. C. Heng y J. R. Tagg.** 2012b. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol.*, 7: 1355-1371.
- Wessels, M. R.** 2005. Streptolysin S. *J. Infect. Dis.*, 192: 13-15.
- Wexler, D. E., R. D. Nelson y P. P. Cleary.** 1983. Human neutrophil chemotactic response to group A streptococci: bacteria-mediated interference with complement-derived chemotactic factors. *Infect. Immun.*, 39: 239-246.
- Whitford, M. F., M. A. McPherson, R. J. Forster y R. M. Teather.** 2001. Identification of bacteriocin-like inhibitors from Rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 569-574.
- Wierzbowski, A. K., K. Nichol, N. Laing, T. Hisanaga, A. Nikulin, J. A. Karlowsky, D. J. Hoban y G. G. Zhanel.** 2007. Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998-2004). *J. Antimicrob. Chemother.*, 60: 733-740.
- Willems, R. y W. van Schaik.** 2009. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol.*, 4: 1125-1135.
- Willems, R. J. L., J. Top, M. van Santen, D. A. Robinson, T. M. Coque, F. Baquero, H. Grundmann y M. J. M. Bonten.** 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.*, 11: 6.

- Willems, R. J., W. P. Hanage, D. E. Bessen y E. J. Feil.** 2011. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35: 872-900.
- Wirawan, R. E., N. A. Klesse, R. W. Jack y J. R. Tagg.** 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1148-1156.
- Wirawan, R. E., K. M. Swanson, T. Kleffmann, R. W. Jack y J. R. Tagg.** 2007. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology*, 153: 1619-1630.
- Worobo, R. W., T. Henkel, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*, 140: 517-526.
- Worobo, R. W., M. J. van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.*, 177: 3143-3149.
- Wullschleger, S.** 2009. Biodiversity and microbial safety of artisanal Malian sour milk fènè and development of adapted starter cultures for controlled production. PhD thesis No. 18287, ETH Zurich, Zurich, Switzerland.
- Xiao, H., X. Chen, M. Chen, S. Tang, X. Zhao y L. Huan.** 2004. Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiol.*, 150: 103-108.
- Xue, J., I. Hunter, T. Steinmetz, A. Peters, B. Ray y K. W. Miller.** 2005. Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1283-1290.
- Yang, R. y B. Ray.** 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, 11: 281-291.
- Yildirim, I., A. Stevenson, K. K. Hsu y S. I. Pelton.** 2012. Evolving picture of invasive pneumococcal disease in Massachusetts children: a comparison of disease in 2007-2009 with earlier periods. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 31: 1016-1021.
- Yonezawa, H. y H. K. Kuramitsu.** 2005. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 49: 541-548.
- Yoon, Y. C., H. J. Park, N. K. Lee y H. D. Paik.** 2005. Characterization and enhanced production of enterocin HJ35 by *Enterococcus faecium* HJ35 isolated from human skin. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 10: 296-303.
- Young, J. e I. B. Holland.** 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta*, 1461: 177-200.
- Yount, N. Y. y M. R. Yeaman.** 2013. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1277: 127-138.
- Yuan, J., J. C. Zweers, J. M. van Dijk y R. E. Dalbey.** 2010. Protein transport across and into cell membranes in bacteria and archaea. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67: 179-199.
- Yuen, G. J. y F. M. Ausubel.** 2014. *Enterococcus* infection biology: lessons from invertebrate host models. *J. Microbiol.*, 52: 200-210.

- Yuzenkova, J., M. Delgado, S. Nechaev, D. Savalia, V. Epshtein, I. Artsimovitch, R. A. Mooney, R. Landick, R. N. Farias, R. Salomon y K. Severinov.** 2002. Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. *J. Biol. Chem.*, 277: 50867-50875.
- Zahradnik, R. T., I. Magnusson, C. Walker, E. McDonell, C. H. Hillman y J. D. Hillman.** 2009. Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 682-690.
- Zalán, Z., E. Németh, A. Baráth y A. Halász.** 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotechnol.*, 43: 219-225.
- Zasloff, M.** 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.
- Zhang, H. X., Y. Y. Qiu, Y. H. Zhao, X. T. Liu, M. Liu y A. L. Yu.** 2014. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. *Mol. Cell. Probes.*, 28: 25-30.
- Zhang, X., J. Top, M. de Been, D. Bierschenk, M. Rogers, M. Leendertse, M. J. Bonten, T. van der Poll, R. J. Willems y W. van Schaik.** 2013. Identification of a genetic determinant in clinical *Enterococcus faecium* strains that contributes to intestinal colonization during antibiotic treatment. *J. Infect. Dis.*, 207: 1780-1786.
- Zhao, T., M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, P. O. E. Mueller y A. H. Parks.** 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 641-647.
- Zhou, N., J. X. Zhang, M. T. Fan, J. Wang, G. Guo y X. Y. Wei.** 2012. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. *J. Dairy Sci.*, 95: 4775-4783.
- Zouhir A., R. Hammami, I. Fliss y J. B. Hamida.** 2010. A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *Protein J.*, 29: 432-439.

APÉNDICES

Listado de abreviaturas y acrónimos

Código genético

Listado de enzimas de restricción y secuencias
dianas específicas

Glosario

Listado de tablas

Listado de figuras

APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS GENERALES

A_x	Absorbancia o densidad óptica a una longitud de onda "x"
aa	Aminoácido(s)
ABC	Transportador del tipo ABC (del inglés <i>ATP Binding Cassette</i>)
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ADNc/cDNA	ADN complementario a una molécula de ARNm
Agg	Proteína de agregación (del inglés <i>Aggregation Substance</i>)
ARDB	Base de datos de genes de resistencia a antibióticos (del inglés <i>Antibiotic Resistance Genes Database</i>)
ARN/RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic acid</i>)
ARNm	Molécula de ARN mensajero
ARNr	Molécula de ARN ribosómico
ARNt	Molécula de ARN de transferencia
ATP	Adenosina trifosfato (del inglés <i>Adenosine Tri-Phosphate</i>)
ATPasa	Enzima con actividad de degradación del ATP
BAL/LAB	Bacterias lácticas (del inglés <i>Lactic Acid Bacteria</i>)
BHI	Medio de cultivo BHI (del inglés <i>Brain Heart Infusion</i>)
BLAST	Del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMM	Medio de cultivo mínimo para <i>Pichia pastoris</i>
BMMY	Medio de cultivo complejo para <i>Pc. pastoris</i>
C5	Proteína del complemento C5
C-	Grupo carboxilo
CAP	Neumonía adquirida en la comunidad (del inglés <i>Community-acquired pneumonia</i>)
Cbn	Carnobacteriocina
CE/EC	Comisión Europea (del inglés <i>European Commission</i>)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CFS	Sobrenadantes libres de células (del inglés <i>Cell-Free culture Supernatants</i>)
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
CLSI	Del inglés <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
Cm	Cloranfenicol

CMI/MIC	Concentración Mínima Inhibidora (del inglés <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
Cur	Curvacina
Cyl	Citolisina o hemolisina β /bacteriocina
DO_x/OD_x	Densidad óptica o absorbancia a una longitud de onda “x” (del inglés <i>Optical Density</i>)
DR	Secuencia repetida directa (del inglés <i>Direct Repeat</i>)
DTS	Sistema de transporte dedicado (del inglés <i>Dedicated Transport System</i>)
EfaAfs	Adhesina de la pared celular de <i>Enterococcus faecalis</i>
EFFCA	Asociación Europea de Cultivos para Alimentos y Piensos (del inglés <i>European Food and Feed Culture Association</i>)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés <i>European Food Safety Authority</i>)
EII^{Bgl}	Sistema fosfotransferasa (PTS) glucósido-específico
EII_t^{Man}	Sistema fosfotransferasa (PTS) manosa-específico
Enl	Enterolisina
Ent	Enterocina
EPM/MPA	Ensayo en placas microtituladoras (del inglés <i>Mitrotiter Plate Assay</i>)
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EPS	Exopolisacárido
Esp	Proteína extracelular de superficie (del inglés <i>Extracellular Surface Protein</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés <i>Food and Drug Administration</i>)
FEEDAP	Panel sobre Aditivos y Productos o Sustancias utilizadas en Alimentación Animal (del inglés <i>Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed</i>)
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
G+C	Contenido de bases guanina y citosina (mol%)
Gar	Garvicina
Gas	Gassericina

GM17	Medio de cultivo M17 suplementado con glucosa al 0,5% (p/v)
GRAS	Reconocido generalmente como seguro (del inglés <i>Generally Recognized as Safe</i>)
GSP	Ruta General de Secreción (del inglés <i>General Secretory Pathway</i>)
HDC	Histidina descarboxilasa
Hir	Hiracina
HPK	Proteína histidín-quinasa (del inglés <i>Histidin Protein Kinase</i>)
Hyl	Hipotética glicosil-hidrolasa (anteriormente hialuronidasa)
IDF	Federación Internacional de Productos Lácteos (del inglés <i>International Dairy Federation</i>)
Inf	Infantaricina
IP	Péptido o factor inductor (del inglés <i>Induction Peptide</i>)
IPD	Enfermedad neumocócica invasiva (del inglés <i>Invasive Pneumococcal Disease</i>)
IR	Secuencia repetida inversa (del inglés <i>Inverted Repeat</i>)
ISP/SOAT	Técnica de inhibición por siembra en picadura (del inglés <i>Stab-On-Agar Test</i>)
LB	Medio de cultivo LB o de Luria-Bertani
Lcn	Lactococina
Ltn	Lacticina
MALDI-TOF MS	Espectrometría de masas
Mcd	Macedocina
MDR	Transportador del tipo MDR o de resistencia a múltiples antibióticos (del inglés <i>Multidrug Resistance</i>)
Met	Metionina
MFα1s	Señal de secreción de la feromona factor α 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (del inglés, <i>Mating Pheromone α-factor 1 Secretion Signal</i>)
mRNA	ARNm o molécula de ARN mensajero
MRS	Medio de cultivo MRS (del inglés de <i>Man, Rogosa and Sharpe</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la metilicina (del inglés <i>Methillicin-Resistant Staphylococcus aureus</i>)
N-	Grupo amino
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>)

NICE	Sistemas de expresión controlados por la nisina A (del inglés <i>Nisin Controlled Expression</i>)
Nis	Nisina
ODC	Ornitina descarboxilasa
OM	Otitis media
OMA/AOM	Otitis media aguda (del inglés <i>Acute Otitis Media</i>)
OMS/ WHO	Organización Mundial de la Salud (del inglés <i>World Health Organization</i>)
orf	Gen hipotético o marco de lectura abierto (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
ORF	Proteína hipotética codificada por un <i>orf</i>
PBP	Proteína de unión a la penicilina (del inglés, <i>Penicillin-Binding Protein</i>)
p/v/w/v	Relación peso/volumen (del inglés <i>weight/volume</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCV7	Vacuna neumocócica conjugada heptavalente (del inglés <i>7-valent pneumococcal conjugate vaccine</i>)
PCV10	Vacuna neumocócica conjugada decavalente (del inglés <i>10-valent pneumococcal conjugate vaccine</i>)
PCV13	Vacuna neumocócica conjugada 13-valente (del inglés <i>13-valent pneumococcal conjugate vaccine</i>)
Ped	Pediocina
pI	Punto isoeléctrico
PMF	Fuerza protón-motriz (del inglés <i>Proton Motive Force</i>)
PPSV23	Vacuna antineumocócica de polisacáridos 23-valente (del inglés <i>23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine</i>)
PTS	Sistema fosfotransferasa (del inglés <i>PhosphoTransferase System</i>)
QPS	Presunción cualificada de seguridad (del inglés <i>Qualified Presumption of Safety</i>)
QS	Modelo de regulación por densidad celular (del inglés <i>Quorum Sensing</i>)
RBS	Lugar de unión al ribosoma (del inglés <i>Ribosome Binding Site</i>)
RR	Proteína reguladora de respuesta (del inglés <i>Response Regulator</i>)
RT-PCR	PCR acoplado a la transcripción inversa (del inglés <i>Reverse Transcription PCR</i>)
Sal	Salivaricina

Sak	Sakacina
SBSEC	Complejo <i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i> (del inglés <i>S. bovis</i> / <i>S. equinus complex</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
Sec	Sistema Sec o Ruta General de Secreción
SOD	Superóxido dismutasa
SP	Péptido señal (del inglés <i>Signal Peptide</i>)
STOAT	Del inglés <i>Streak-On-Agar Test</i>
TDA/ADT	Técnica de difusión en agar (del inglés <i>Agar Diffusion Test</i>)
TDC	Tirosina descarboxilasa
TFA	Ácido trifluoroacético
THB	Medio de cultivo THB (del inglés <i>Todd-Hewitt Broth</i>)
Thm	Termofilina
TMD	Dominio transmembrana (del inglés <i>Transmembrane Domain</i>)
TMS	Segmento transmembrana (del inglés <i>Transmembrane Segment</i>)
TSA	Medio de cultivo TSA (del inglés <i>Tryptic Soya Agar</i>)
TSB	Medio de cultivo TSB (del inglés <i>Tryptic Soya Broth</i>)
Ubc	Ubericina
Ubl	Uberolisina
UE/EU	Unión Europea (del inglés <i>European Union</i>)
VRE	Enterococos resistentes a la vancomicina (del inglés <i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i>)
v/v	Relación volumen/volumen
YPD	Medio de cultivo complejo para el crecimiento de levaduras (del inglés <i>Yeast Peptone Dextrose</i>)
Zeo	Zeocina

2. ABREVIATURAS DE UNIDADES

Da	Dalton
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
g	Gramo
l	Litro

mg	Miligramos
µg	Microgramos
ml	Militros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
ng	Nanogramos
pb/bp	Pares de bases/ <i>Base pairs</i>
UB/BU	Unidad de bacteriocina/ <i>Bacteriocin unit</i>
ufc/cfu	Unidad formadora de colonia/ <i>Colony forming unit</i>

3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS

B.	<i>Bacillus</i> spp.
C.	<i>Carnobacterium</i> spp.
Cl.	<i>Clostridium</i> spp.
E.	<i>Enterococcus</i> spp.
Ec.	<i>Escherichia</i> spp.
H.	<i>Haemophilus</i> spp.
Hi.	<i>Helicobacter</i> spp.
L.	<i>Lactococcus</i> spp.
Ls.	<i>Listeria</i> spp.
Lb.	<i>Lactobacillus</i> spp.
Le.	<i>Leuconostoc</i> spp.
P.	<i>Pediococcus</i> spp.
Pc.	<i>Pichia pastoris</i> spp.
Pr.	<i>Propionibacterium</i> spp.
Ps.	<i>Pseudomonas</i> spp.
R.	<i>Rhizopus</i> spp.
S.	<i>Streptococcus</i> spp.
Sc.	<i>Saccharomyces</i> spp.
St.	<i>Staphylococcus</i> spp.

4. ABREVIATURAS Y MASAS MOLECULARES DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviaturas		Masa molecular (Da)
No modificados postraduccionalmente			
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117
Modificados postraduccionalmente			
Deshidroalanina	Dha	-	
Deshidrobutirina	Dhb	-	
Lantionina	Lan	-	
β-metil-lantionina	MeLan	-	

APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO

		U	C	A	G		
Primera posición (extremo 5')	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	Tercera posición (extremo 3')
		UUC }	UCC }	UAC }	UGC }	C	
		UUA } Leu	UCA }	UAA *	UGA *	A	
		UUG }	UCG }	UAG *	UGG } Trp	G	
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
		CUC }	CCC }	CAC }	CGC }	C	
		CUA }	CCA }	CAA } Gln	CGA }	A	
		CUG }	CCG }	CAG }	CGG }	G	
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC }	ACC }	AAC }	AGC }	C	
		AUA }	ACA }	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
		AUG } Met	ACG }	AAG }	AGG }	G	
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
		GUC }	GCC }	GAC }	GGC }	C	
		GUA }	GCA }	GAA } Glu	GGA }	A	
		GUG }	GCG }	GAG }	GGG }	G	

*Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco.

APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS

Enzima	Secuencia diana ^a
<i>Hind</i> III	A▼AGCTT TTCGA▲A
<i>Kpn</i> I	GGTAC▼C C▲CATGG
<i>Sac</i> I	GAGCT▼C C▲TCGAG
<i>Sal</i> I	G▼TCGAC CAGCT▲G
<i>Sph</i> I	GCATG▼C C▲GTACG
<i>Xba</i> I	T▼CTAGA AGATC▲T
<i>Xma</i> I	C▼CCGGG GGGCC▲C

^aEl sitio de restricción se indica con el símbolo ▼.

APÉNDICE 4. GLOSARIO

ADN complementario	ADN monocatenario sintetizado <i>in vitro</i> a partir de un molde de ARNm empleando una ADN polimerasa ARN-dependiente.
ADN polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis de ADN mediante la adición de desoxinucleótidos trifosfato en sentido 5'–3' a un cebador de ARN o ADN utilizando como molde una cadena de ADN complementario.
Antibiótico	Compuesto antimicrobiano natural sintetizado por microorganismos mediante complejos multienzimáticos (metabolito secundario) que inhibe el crecimiento o la proliferación de bacterias (bacteriostático) o que provoca su muerte (bactericida) y que se emplea como agente quimioterapéutico para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales. Actualmente, muchos antibióticos son sintéticos y presentan modificaciones químicas que mejoran su potencia o amplifican su espectro de acción.
Bacteriocina	Péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática).
Bacteriocinogenicidad	Capacidad de producir bacteriocinas.
Biopelícula/Biofilm	Ecosistema microbiano organizado asociado a una superficie viva o inerte y embebido en una matriz extracelular protectora constituida por exopolisacáridos que le protege frente a mecanismos de defensa del hospedador, tales como la fagocitosis, y reduce su susceptibilidad a los antimicrobianos.
Cebador	Oligonucleótido empleado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
CMI	Concentración Mínima Inhibidora, que se define como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano.

Cultivo probiótico	Cultivos mixtos o monoespecíficos de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras), y componentes de las células microbianas que ejercen efectos beneficiosos en la salud y en el bienestar del hospedador, en algunos casos como consecuencia de la mejora de las propiedades de su microbiota indígena.
Efecto antimicrobiano sinérgico	La utilización combinada de dos péptidos antimicrobianos permite obtener una actividad antimicrobiana mayor que la correspondiente al efecto aditivo de los péptidos evaluados independientemente.
Electroforesis bidimensional (2D SDS-PA)GE	Técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de mezclas complejas de proteínas. Las proteínas son separadas en dos fases: (i) en la primera, se utiliza un gel con gradiente de pH en condiciones desnaturalizantes para separar las proteínas de acuerdo con su punto isoelectrico (isoelectroenfoque) y (ii) en la segunda, las proteínas se separan en función de su masa molecular por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Tras la tinción del gel, los <i>spots</i> de proteínas se extraen del mismo para llevar a cabo su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.
Extensión N-terminal	Secuencia de 15-30 aminoácidos localizada en la región N-terminal de la mayoría de las proteínas recién sintetizadas que será eliminada durante o tras el proceso de secreción de la proteína a través de la membrana citoplasmática.
Factor de virulencia	Molécula efectora que potencia la capacidad de un microorganismo de causar enfermedad.
Fagocitosis	Proceso de ingestión de microorganismos o partículas realizado por leucocitos que produce una activación temprana de la respuesta inflamatoria antes de la producción de anticuerpos y que juega un papel importante como defensa innata frente a los patógenos.
Gen	Segmento de ADN que codifica un péptido, una proteína o una molécula de ARN.

Metabolito primario	Producto del metabolismo bacteriano generado durante la fase exponencial de crecimiento.
Metabolito secundario	Producto del metabolismo bacteriano, no esencial para el crecimiento o el mantenimiento de las funciones celulares, generado durante la fase estacionaria de crecimiento.
Molécula <i>docking</i>	Molécula que facilita la interacción de las bacteriocinas con sus diana(s) celular(es).
Operón	Conjunto de genes transcritos bajo el control de un único promotor, cuyos productos intervienen en la misma función biológica.
Péptido señal	Extensión N-terminal de las proteínas recién sintetizadas reconocida por el sistema Sec o Ruta General de Secreción.
<i>Pili</i>	Estructuras filamentosas proteicas similares a los flagelos en su composición y morfología, pero que no participan en la motilidad de la célula bacteriana. Son menos abundantes, más cortas y se relacionan con la adherencia de las bacterias a superficies inertes o vivas. De gran importancia en este sentido es la adherencia específica que presentan muchas bacterias a determinados epitelios jugando un papel fundamental en la colonización
Preprobacteriocina	Precursor de la bacteriocina biológicamente inactivo constituido por una extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal) y un propéptido C-terminal (probacteriocina).
Probacteriocina	Forma de la bacteriocina en la que, en su caso, se ha eliminado la extensión N-terminal implicada en su secreción, pero que aún no ha sufrido las modificaciones postraduccionales que darán lugar a la bacteriocina madura.
Resistencia adquirida	Resistencia de una cepa particular de una especie a un determinado antibiótico por la modificación de la carga genética que puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética.
Resistencia adquirida transmisible	Resistencia de una cepa particular de una especie a un determinado antibiótico debido a la presencia de determinantes

genéticos que se transfieren a través de plásmidos, transposones o integrones de una bacteria a otra (transmisión horizontal).

Resistencia intrínseca

Resistencia inherente de una especie bacteriana por la ausencia de diana a un determinado antibiótico. También se denomina resistencia natural.

Secuencia -10

Secuencia de la región promotora de un gen situada aproximadamente 10 pb delante del codón de iniciación de un gen, cuya secuencia consenso es TATAAT.

Secuencia -35

Secuencia de la región promotora de un gen situada aproximadamente 35 pb delante del codón de iniciación de un gen, cuya secuencia consenso es TTGACA.

Secuencia consenso

Segmento de un gen/proteína que es compartido por un gran número de miembros de una familia génica/proteica, cuya secuencia representa los residuos nucleotídicos/aminoácidos encontrados más frecuentemente en cada posición (residuos conservados).

Serotipo

Clasificación de un microorganismo en función de los antígenos que presenta en su superficie celular, lo que permite diferenciarlo de otros de la misma especie mediante pruebas serológicas.

Sistema de secreción del tipo ABC

Sistema de secreción de péptidos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder en el que participan una proteína transportadora del tipo ABC y una proteína accesoria, dedicados específicamente a la secreción de una sustancia determinada.

Sistema Sec

Sistema de secreción de péptidos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo péptido señal en el que participan los productos de los genes Sec y las peptidasas señal encargadas del procesamiento del prepropéptido.

Traducción

Proceso de síntesis de una proteína a partir de una molécula de ARNm (que contiene la información genética necesaria para codificar una o varias proteínas mediante su traducción a producto génico en los ribosomas).

Transcripción	Proceso de síntesis de una molécula de ARNm a partir del ADN.
Transformación	Proceso de asimilación de moléculas de ADN por una célula bacteriana.
Transportador del tipo ABC	Homodímero de proteína(s) (aprox. 700 aa) que contiene: (i) un dominio C-terminal o de unión al ATP con actividad ATPasa, y (ii) un dominio central integral de membrana, que contiene 4–6 segmentos transmembrana. En la mayoría de los transportadores del tipo ABC dedicados al transporte de bacteriocinas existe un dominio adicional o dominio N-terminal con actividad proteolítica, que contiene dos secuencias conservadas denominadas dominio cisteína y dominio histidina.
Transposón	Elemento genético móvil o secuencia de ADN con capacidad de desplazarse (transponerse) de un lugar del ADN a otro.
Unidad de bacteriocina	Unidad empleada para la cuantificación de la actividad antimicrobiana empleando la prueba EPM/MPA que se define como “el recíproco de la máxima dilución de una muestra que inhibe en un 50% el crecimiento del microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora”.
Vacuna	Cualquier preparación de microorganismos muertos o vivos atenuados o de productos o derivados de microorganismos destinados a generar inmunidad frente a una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos.
Vector	Molécula de ADN de pequeño tamaño molecular con capacidad de replicarse, en la que se inserta un fragmento de ADN exógeno objeto de estudio (por ej.: plásmidos).

APÉNDICE 5. LISTADO DE TABLAS

Capítulo II

Tabla II.1. Microorganismos adicionados durante las fermentaciones industriales como cultivos iniciadores, protectores y/o adjuntos.....	25
Tabla II.2. Productos alimenticios obtenidos mediante fermentación tradicional.....	26
Tabla II.3. Bacterias lácticas con estatus QPS	31
Tabla II.4. División taxonómica del género <i>Streptococcus</i> adaptada de Poyart <i>et al.</i> (1998)..	43
Tabla II.5. División taxonómica del género <i>Streptococcus</i> adaptada de Glazunova <i>et al.</i> (2010)	44
Tabla II.6. Preparaciones probióticas formuladas con cepas del género <i>Streptococcus</i> como principio activo.....	52
Tabla II.7. Principales factores de virulencia descritos en <i>Streptococcus</i> spp	56
Tabla II.8. Sistemas de nomenclatura establecidos para la denominación de los serotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	59
Tabla II.9. Principales factores de virulencia descritos en <i>Streptococcus pneumoniae</i>	63
Tabla II.10. Serotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> incluidos en las vacunas antineumocócicas	70
Tabla II.11. Principales diferencias entre las bacteriocinas y los antibióticos.....	74
Tabla II.12. Características diferenciales de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.....	75
Tabla II.13. Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas	81
Tabla II.14. Bacteriocinas producidas por <i>Streptococcus</i> spp	102

Capítulo III/Chapter III

Table III.1. Bacteriocinogenic LAB and indicator microorganisms used in this study	126
Table III.2. Primers and PCR conditions for detection of virulence factor genes	131

Table III.3. Primers and PCR conditions for detection of HDC, TDC and ODC genes.....	132
Table III.4. Primers and PCR conditions for detection of bacteriocin structural genes.....	134
Table III.5. Antimicrobial activity of bacteriocinogenic LAB against <i>S. pneumoniae</i> clinical strains	137
Table III.6. Anti-pneumococcal extracellular activity of six selected bacteriocinogenic LAB	139
Table III.7. Influence of growth media and incubation conditions on bacterial growth, culture-pH and anti-pneumococcal activity of <i>S. infantarius</i> LP90	141
Table III.8. Antibiotic susceptibility of <i>S. infantarius</i> LP90	143
Table III.9. Purification of the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by <i>S. infantarius</i> LP90	145

Capítulo IV/Chapter IV

Table IV.1. Predicted Open Reading Frames (ORFs) in the 17,730-bp fragment of genome from <i>S. infantarius</i> LP90 and the closest relationships of the deduced proteins	173
Table IV.2. Hypothetical bacteriocins and induction factor encoded by <i>S. infantarius</i> LP90	175
Table IV.3. Purification of the bacteriocins produced by <i>S. infantarius</i> LP90 using the procedure P1	177
Table IV.4. Purification of the bacteriocins produced by <i>S. infantarius</i> LP90 using the procedure P2	180

Capítulo V/Chapter V

Table V.1. Strains and plasmids used in this study.....	197
Table V.2. Primers and PCR products used in this study.....	199
Table V.3. Purification of InfA ₁ produced by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA1 grown in GM17 at 30 °C.....	208
Table V.4. Purification of InfA ₂ produced by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₂ grown in GM17 at 30 °C.....	210

Table V.5. Purification of InfA ₁ and InfA ₂ produced by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₁ A ₂ grown in GM17 at 30 °C	211
---	-----

Capítulo VI/Chapter VI

Table VI.1. MICs of InfA _{1-P} and chemically synthesized InfA _{1-S} and InfA _{2-S} tested independently and combined at different bacteriocin ratios	235
---	-----

APÉNDICE 6. LISTADO DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 2.1. Imagen de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	58
Figura 2.2. Representación gráfica por continente de los cinco serotipos de <i>S. pneumoniae</i> aislados con mayor frecuencia de infecciones neumocócicas invasivas	61
Figura 2.3. Receptores implicados en el mecanismo de acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas	85
Figura 2.4. Principales modelos propuestos para la formación de poros por las bacteriocinas en las membranas de las bacterias sensibles	86
Figura 2.5. Principales mecanismos de acción propuestos para las bacteriocinas de las bacterias lácticas	87
Figura 2.6. Representación esquemática de las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de bacteriocinas de la clase II	88
Figura 2.7. Representación esquemática de un sistema de secreción ABC clásico en bacterias Gram-positivas (A) y Gram-negativas (B)	94
Figura 2.8. Transporte y procesamiento de proteínas mediante la ruta Sec	98

Capítulo III/Chapter III

Figure 3.1. Antimicrobial activity of CFS from <i>S. infantarius</i> LP90 subjected to different treatments, as determined by an ADT	142
Figure 3.2. RP-FPLC chromatography of the anti-pneumococcal bacteriocin secreted by <i>S. infantarius</i> LP90	144

Figure 3.3. Mass spectrometry analysis of the purified anti-pneumococcal bacteriocin secreted by <i>S. infantarius</i> LP90	145
--	-----

Figure 3.4. Amino acid sequence alignment of the partial N-terminal sequence of the anti-pneumococcal bacteriocin infantaricin A secreted by <i>S. infantarius</i> LP90 and a hypothetical protein of unknown function deduced from the <i>S. infantarius</i> ATCCBAA-102 genome (accession no. ZP_02920122)	146
---	-----

Capítulo IV/Chapter IV

Figure 4.1. Nucleotide sequence of a 17,730-bp region from the <i>S. infantarius</i> LP90 genome	167
---	-----

Figure 4.2. Physical map showing the genetic organization of a 17,730-bp multibacteriocinogenic cluster present in <i>S. infantarius</i> LP90.....	174
---	-----

Figure 4.3. Transcriptional (A) and (B), and cotranscriptional (C) analyses of the multibacteriocinogenic cluster from <i>S. infantarius</i> LP90 by RT-PCR.....	176
---	-----

Figure 4.4. RP-FPLC chromatography showing the peptides obtained from a <i>S. infantarius</i> LP90 CFS subjected to purification procedure P1	178
--	-----

Figure 4.5. Mass spectrometry analysis of the antimicrobial peptides obtained from a <i>S. infantarius</i> LP90 CFS using purification procedure P1	178
--	-----

Figure 4.6. RP-FPLC chromatography showing the peptides obtained from a <i>S. infantarius</i> LP90 CFS subjected to purification procedure P2	180
--	-----

Figure 4.7. Mass spectrometry analysis of the antimicrobial peptides obtained from a <i>S. infantarius</i> LP90 CFS using purification procedure P2	181
--	-----

Figure 4.8. Mass spectrometry analysis of the proteins obtained from a <i>S. infantarius</i> LP90 CFS using purification procedure P3	182
--	-----

Capítulo V/Chapter V

Figure 5.1. Strategy for the construction of the recombinant plasmids pPIA ₁ and pPIA ₂ , derived from pPICZαA	201
---	-----

Figure 5.2. Strategy for the construction of the recombinant plasmids pMI, pMIA ₁ , pMIA ₂ and pMIA ₁ A ₂ derived from pMG36c	204
--	-----

Figure 5.3. Antimicrobial activity of the elution fractions from the hydrophobic interaction chromatography of the CFS of <i>Pc. pastoris</i> X-33A ₁ and <i>Pc. pastoris</i> X-33A ₂ against <i>P. damnosus</i> CECT4797, as determined by an ADT	207
Figure 5.4. Antimicrobial activity of the elution fractions from the hydrophobic interaction chromatography of the CFS of <i>Pc. pastoris</i> X-33A ₁ and <i>Pc. pastoris</i> X-33A ₂ against <i>S. pneumoniae</i> 66405, as determined by an ADT	207
Figure 5.5. RP-FPLC chromatography of the InfA ₁ secreted by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₁	209
Figure 5.6. RP-FPLC chromatography of the InfA ₂ secreted by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₂	210
Figure 5.7. Antimicrobial activity of the fractions A1-15 and A2-14 obtained from the last RP-FPLC purification step of CFS of <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₁ and <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₂ , respectively, against <i>S. pneumoniae</i> 66405	211
Figure 5.8. RP-FPLC chromatography of InfA ₁ and InfA ₂ secreted by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₁ A ₂	212
Figure 5.9. Mass spectrometry analysis of the purified antimicrobial peptides secreted by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₁	213
Figure 5.10. Mass spectrometry analysis of the purified antimicrobial peptides secreted by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₂	214
Figure 5.11. Mass spectrometry analysis of the purified antimicrobial peptides secreted by <i>L. lactis</i> NZ9000-IA ₁ A ₂	215
 Capítulo VI/Chapter VI	
Figure 6.1. Antimicrobial activity of InfA _{1-P} and InfA _{1-S} and InfA _{2-S} tested independently and combined at different ratios against <i>S. pneumoniae</i> 66405, as determined by an ADT	234
Figure 6.2. Mode of action of the antimicrobial peptides of <i>S. infantarius</i> LP90 against <i>S. pneumoniae</i> 66405 in broth	235
Figure 6.3. Effect of InfA _S (InfA _{1-S} -InfA _{2-S} ; 1:1 ratio) on <i>S. pneumoniae</i> 66405 biofilm formation and pre-formed biofilms	236

Figure 6.4. <i>Effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on S. pneumoniae 66405 α-hemolytic activity.....</i>	237
Figure 6.5. <i>Functional stability of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) in human saliva</i>	238
Figure 6.6. <i>Mode of action of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) against S. pneumoniae 66405 in human saliva</i>	239
Figure 6.7. <i>Effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on total anaerobic counts of saliva.....</i>	240
Figure 6.8. <i>Effect of InfA_S (InfA_{1-S}-InfA_{2-S}; 1:1 ratio) on the composition of salivary anaerobic microbiota.....</i>	240

